

生命科学实验指南系列



Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications

分子细胞遗传学
——技术与应用

〔加〕范耀山　著
刘青杰　等　译

科学出版社

生命科学实验指南系列·典藏版

分子细胞遗传学——技术与应用

Molecular Cytogenetics：Protocols and Applications

〔加〕范耀山　著
刘青杰　等译

科学出版社
北京

图字：01-2005-6305号

内 容 简 介

“生命科学实验指南系列”图书均出自名家，包括众多从Cold Spring Harbor Laboratory Press和John Wiley & Sons等国际知名出版社引进的实验室必备工具书，是生命科学领域最先进、实用、权威的实验手册类优秀图书。该系列图书简单明了，囊括了全世界最著名的生物类实验室操作方法，无论是初学者还是需要深入研究的科研工作者都能从中获益。该系列图书在读者群中有较高的知名度和美誉度，特别是以《分子克隆实验指南》和《精编分子生物学实验指南》为代表，堪称经典，分别被喻为生命科学领域的“蓝宝书”和“红宝书”。现挑选其中的精品集结成典藏版。

The original English language work has been published by HUMANA PRESS Totowa, New Jersey, U. S. A. ©2002 by Humana Press. All rights reserved.

图书在版编目（CIP）数据

生命科学实验指南系列：典藏版/雷东锋等编著. —北京：科学出版社，2016

ISBN 978-7-03-047486-5

Ⅰ.①生… Ⅱ.①雷… Ⅲ. ①生命科学–实验–指南 Ⅳ.①Q1-0

中国版本图书馆CIP数据核字(2016)第043878号

责任编辑：王 静 李 悦

责任印制：张 伟 / 封面设计：刘新新

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码：100717

http://www.sciencep.com

北京厚诚则铭印刷科技有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2016年7月第 一 版 开本：787×1092 1/16

2016年7月第一次印刷 印张：1310 1/2

字数：31 074 000

定价：4500.00元

(如有印装质量问题，我社负责调换)

翻译人员名单

（按姓名拼音排列）

陈　艳	黄　英	刘青杰
马　芬	王晓维	韦　丽
吴　畏	袁海昕	曾　瑄
赵宝锋		

校对人员名单

（按姓名拼音排列）

陈德清	陈晓宁	范耀山
刘青杰	王明荣	曾　瑄

译 者 序

荧光原位杂交（FISH）技术是在20世纪80年代末期建立起来的。FISH的应用研究证实：该技术成为衔接细胞遗传学和分子遗传学之间的一道桥梁，并开创了一门新的学科——分子细胞遗传学（molecular cytogenetics）。目前FISH技术在国际上广泛应用于基因定位、肿瘤遗传学、辐射生物学、遗传病诊断和产前诊断、试管婴儿植入前诊断等领域。

我国的分子细胞遗传学开始于20世纪90年代初，由于探针、荧光显微镜及图像分析系统都比较昂贵，仅有几家大型医疗和科研机构能进行FISH实验及结果分析。随着我国经济的发展和科研经费投入的增加，各大医院、科研机构相关实验室以及具有辅助生殖技术的中心开始关注FISH及相关技术，并配备了仪器设备。在十几年间，分子细胞遗传学相关技术也在全国各地的实验室相继建立。随着对FISH等技术应用需求的增加，对相关技术的培训要求也增加，但目前国内没有一本专著详细介绍分子细胞遗传学相关技术及其应用。许多科技人员和临床医生苦于不知道如何开始在自己的实验室建立FISH相关实验方法，实验中出现问题也不知如何解决。

在2003年 *Am. J. Hum. Genet.* 和 *J. Pathol.* 的两篇书评中我们了解到Humana Press出版的 *Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications* 一书是 *Methods in Molecular Biology* 系列丛书的第204卷，正好可以满足国内学者按步骤进行分子细胞遗传学技术操作的需求。该书是一部有关分子细胞遗传学相关技术的权威性著作，全面概括了当代分子细胞遗传学相关技术从基本原理、技术方法到实际应用的各个方面，实为关于FISH相关技术原理、操作及应用的代表性著作。我们希望本书的翻译出版，将有助于推动我国分子细胞遗传学技术的发展和普及。

本书的翻译人员均为医学临床或科研相关专业的一线科技人员、博士、硕士，每位审校专家均在密切相关的研究、临床工作中积累了丰富的经验。在翻译过程中，我们力求保持原书的本意，逐句对应翻译，有些新的名词在中文中还未确定如何翻译，我们尽量将英文保留，使读者在阅读过程中不会因为我们的不确切翻译而引起误解。但是原著中明显的错误我们经过科学查证后尽量给予改正，以求更加合理。

在本书出版之际，首先要感谢原著主编美国迈阿密大学的范耀山博士为我们提供了原著，审校了部分章节并为中译本作序。中国医学科学院基础医学研究所

沈岩院士对本书的翻译给予了热情关心和大力支持，在此表示衷心的感谢！我们还要感谢中国疾病预防控制中心辐射防护与核安全医学所、国家人类基因组北方研究中心、北京协和医院、南京医科大学江苏省人民医院生殖中心、天津医科大学附属肿瘤医院、首都医科大学朝阳医院遗传中心和军事医学科学院基础医学研究所等单位的支持！

感谢科学出版社马学海博士和李悦编辑给予的支持，由于他们出色的工作本书才得以翻译和出版。

由于我们的知识、能力和水平的限制，对于某些技术的细节缺乏感性认识，在本书翻译过程中难免有错误和不妥之处，希望得到国内同道专家和读者的批评指正！

刘青杰

2006年6月

中 译 本 序

《分子细胞遗传学——技术与应用》一书的翻译的确让我有些兴奋。然而，生命及医学科学发展的速度总是把书的内容抛在后边，这使每一位著者和编者都不免遗憾，我也毫不例外。

近代人类细胞遗传学的发展大概可分为三个阶段，每一个阶段都是以新技术的出现和应用为标志。第一个阶段是细胞培养、秋水仙素以及低渗溶液的使用导致了对人类染色体数目的正确认识（1956 年）和 21 三体的发现（1960 年）。第二个阶段以染色体显带技术的发现（1971 年）和应用为特征，细胞遗传学成为医学遗传学的一个重要分支。从 20 世纪 80 年代末 90 年代初开始，荧光原位杂交技术的发展和广泛的临床应用又把细胞遗传学推上一个新的台阶。这一技术对人类基因定位、人类基因组计划以及近代的医学遗传学的整体发展，应该说是功不可没。本书搜集了近十几年来具有代表性的中期染色体及间期细胞核荧光原位杂交的技术方法学及其应用，希望本书的翻译对国内同行学者能够有所益助。

近几年来，基因芯片技术已经引起遗传学和分子生物学界的极大兴趣。事实上，比较基因组杂交芯片技术（microarray-based comparative genomic hybridization）正在把细胞遗传学推向一个崭新的历史阶段。无疑这一技术的应用将填补传统的细胞遗传学和分子遗传学之间的巨大鸿沟，并揭示大量导致人类发育缺陷的基因组变异。本书关于比较基因组杂交芯片方法及应用的介绍，希望能起到抛砖引玉的作用。

最后，我想借此机会对曾给予我在人类染色体技术方面启蒙的周焕庚和郑斯英两位教授、曾把我引入医学遗传学和细胞遗传学大门的博士生导师李璞教授和刘权章教授表示最深情的祝福，也对翻译本书的国内专家教授们表示衷心的感谢。

范耀山

2006 年 4 月

原 著 序

在过去的 20 年中，以 DNA 探针与中期染色体和间期核的荧光原位杂交（FISH）技术为代表的分子细胞遗传学新技术有了很大的发展。许多 FISH 技术已经应用在诊断中，但一些 FISH 技术仍主要用于科研。目前，商业化的 FISH 探针和试剂盒多达几百种，并且有越来越多的趋势。FISH 作为一种有效的诊断工具，已经广泛应用在多个医学领域中，包括儿科学、医学遗传学、围产医学、生殖医学、病理学、血液学和肿瘤学。

临床医生往往困惑于五花八门的 FISH 技术，不知该进行何种 FISH 检测。提供 FISH 分析服务的实验室收到待检测的样品，但送检医生并没有指明需要哪种 FISH 分析，这种情况也经常发生。另一方面，在实验室中进行 FISH 分析的细胞遗传学家和技术人员需要根据病例的不同，确定进行哪一种 FISH 实验操作程序、使用哪一种探针，以得到有意义的结果。为获得最好的实验结果，必须选择合适的 DNA 探针、可靠的实验操作程序以及适当的质量保障手段，并且在经典遗传学、分子遗传学以及与实验有关的特定医学领域有足够的知识，以便正确解释 FISH 实验结果，并将之与诊断、治疗及预后相关联。

本书为从事遗传学和肿瘤学诊断服务的实验室医生和科研人员，提供了绝大多数 FISH 技术的详尽步骤、易于掌握的实验操作程序。为获得最佳实验结果的注意事项和疑难解答都是基于每一位编者的直接经验。在许多章节中，对各种技术的应用以及方法本身的敏感性、局限性和缺陷做了详细全面的阐述；本书的某些章节还对一些特定主题进行了专门阐述。尽管本书着重于诊断方面，但书中提供的详细深入的、艺术化的实验方法，同样适用于进行人类发育领域和人类肿瘤分子生物学等基因组研究的科研人员。

希望本书能够为细胞遗传学家、病理学家、专业技术人员、初学者以及学习细胞遗传学、血液学和分子病理学的在校学生起到实验指导和参考作用。本书的编者曾特别考虑到临床医生和其他卫生行业专家的需求，试图对他们所从事的发育缺陷、生殖或肿瘤性疾病等的诊断和临床控制的分子遗传学检测有帮助。

Yao-Shan Fan

（陈艳 译，刘青杰　范耀山 校）

目　　录

第四部分　在肿瘤学中的应用

第一部分　基本概念和技术



第 1 章　医学分子细胞遗传学概论

Yao-Shan Fan

1. 引言

“染色体”这个词在一个世纪以前从希腊语中引入，意思是“彩色小体”。正如细胞遗传学是研究染色体的学科，分子细胞遗传学是主要应用基于原位杂交的有关技术来分析基因组改变的科学。

20 世纪 80 年代后期，起源于放射性杂交的荧光原位杂交（FISH）技术开始用于定位人类基因[1~4]。很快该技术在临床细胞遗传学实验室中被用于分析染色体重排和标记染色体[5,6]、微小缺失[7]和常见非整倍体的产前诊断[8,9]，同时，大量 DNA 探针的商业化，进一步使得分子细胞遗传学在临床上广泛应用。许多 FISH 新技术已经出现，这些新技术包括引物介导的原位 DNA 合成[10]、纤维 FISH[11,12]、比较基因组杂交（CGH）[13]、染色体显微切割[14,15]、光谱染色体核型分析（SKY）[16]、多色荧光原位杂交（M-FISH）[17,18]、彩色显带[19]、多重亚端粒 FISH[20]以及芯片 CGH[21,22]。借助目前的这些 FISH 技术，可以检测到单基因缺失或重排，可以观察到染色体的微小易位，可以确定肿瘤细胞原癌基因的拷贝数以及充分描述非常复杂的重排。应用间期 FISH，不需要细胞培养和染色体制备，就可以分析人类所有组织中处于任何分裂周期细胞的基因组改变。FISH 技术在过去 20 年的发展，使得细胞遗传学进入了分子时代，并使这种“彩色小体”更加多彩和明亮。

2. FISH 技术

2.1　DNA 探针

所有类型的人类 DNA 序列均已用作分子细胞遗传学研究中的探针。这些 DNA 序列包括：①单拷贝序列；②α 卫星和端粒 DNA 的重复序列；③通过 PCR 扩增的位点特异性 DNA；④被克隆到黏性质粒、人工细菌染色体（BAC）、源于 P1 的人工染色体（PAC）、酵母人工染色体（YAC）等载体中的长基因组 DNA 序列；⑤显微切割得到的染色体区带或染色体臂特异序列；⑥通过流式细胞仪分选染色体建立的 DNA 文库。制备探针时将 DNA 序列直接标记荧光染料或用生物素或地高辛间接标记，后一种标记方式可通过免疫荧光染色来检测。

DNA 序列可以标记成单色、双色或多色。在单一杂交实验中，可以用单个探针，也可以用多个探针。近年来，由于许多荧光标记 DNA 探针的商业化，使得在临床上应用 FISH 操作更加简单、成本更低，并且可靠。

2.2 特定 DNA 序列的 FISH

特定 DNA 序列的 FISH 代表了最基本的分子遗传学技术。用作探针的 DNA 片段可以是一个功能基因、一个特定的染色体区域或位点。FISH 操作的基本步骤包括标记 DNA 探针、制备间期或中期染色体标本、原位杂交和荧光显微镜下观察[4]。特定 DNA 序列的 FISH 最常用于微缺失综合征的诊断、肿瘤细胞基因融合或重排的检测。

2.3 染色体涂染

染色体涂染是指用特定染色体文库[23]、Alu 和 L1 PCR[24]或染色体显微切割[25]等方式得到的探针进行的 FISH。当探针中包含某一染色体的特定序列和重复序列时，中期染色体分裂相中同源的两条染色体整个显示荧光（即被涂染）。染色体臂特异性探针可以使得特定染色体的长臂或短臂被涂染。应用含 3×8 组合的装置，可以同时涂染 24 种（46 条）染色体，并可通过标准荧光显微镜按顺序探测[26]。染色体涂染往往作为确定和描述结构性重排的辅助手段。

2.4 光谱染色体核型分析（SKY）

SKY 是一种自动化染色体涂染程序[16]。探针混合物是由流式分选人类染色体产生的染色体特异性文库组成。这些探针是用 5 种荧光素：罗丹明、德克萨斯红、Cy5、FITC（异硫氰酸荧光素）和 Cy5.5 的组合直接标记。借助光谱的计算机分类方法，可以同时观察到人类的 24 种不同颜色的染色体。在描述癌细胞复杂染色体重排[27~29]和新出现的组成结构异常[30,31]中证实 SKY 是一种非常有用的技术。SKY 可以观察到的最小 DNA 改变为 1～2Mb，因此该方法是检测微小易位的有效工具[32]。

2.5 多色 FISH（M-FISH）

M-FISH 也称为多荧光 FISH 或多重 FISH[17,18]，类似于 SKY 的是用多种荧光素组合标记探针。与光谱分析不同的是：通过计算机软件的辅助，采用一系列荧光素特异滤光片来检测特定颜色的 24 条染色体。鉴于含有多种滤光片的转盘

可以安装到荧光显微镜上，为分析24种颜色设计的软件已经可以加入到用于常规染色体核型分析的数字化图像系统。因此，对 M-FISH 研究不需另外的图像系统。

2.6 显微切割后 FISH（MicroFISH）

为了进行 MicroFISH[14,15]，用显微操作臂从中期分裂相中切取一条染色体、一个标记染色体或一个特定的染色体条带。经 PCR 扩增切取的 DNA，再标记成探针。用这种探针在正常参考中期分裂相上进行 FISH，揭示有问题的染色体或染色体区域的成分，术语“反向原位杂交”已经用来描述此种技术。MicroFISH 对描述结构重排和标记染色体是很有用的。显微切割常被用作生产特定染色体、染色体臂或特殊染色体区域商业探针的途径之一。

2.7 比较基因组杂交（CGH）

比较基因组杂交（comparative genomic hybridization，CGH）因被检测 DNA 与正常参考 DNA 进行比较的一种 FISH 技术而得名[13,33]，同样也称为“反向原位杂交”。被检测 DNA 一般标记成绿色，正常参考 DNA 标记成红色。DNA 混合物杂交到由血培养制备的正常中期分裂相染色体上。通过测定红色与绿色荧光强度的比例，确定被检测 DNA 在某染色体或染色体区域的重复或缺失。CGH 方法可检测到 DNA 片段的改变最小限值为 10～20Mb。CGH 在描述新出现的非平衡性组成异常中非常有用[34]。由于不用制备被检测细胞或组织的中期染色体，却可以扫描整个基因组的获得或丢失，CGH 已被广泛用于实体瘤的研究中[33]。

2.8 引物介导的原位 DNA 标记（PRINS）

PRINS 是指将短寡核苷酸引物与目标序列原位退火（reannealing），用 Taq 聚合酶延伸序列的同时将荧光素标记到目标序列的过程[10]。在荧光显微镜下分析目标序列情况。PRINS 方法最早的目标序列是每个染色体特异的一小段 α 卫星 DNA。整个反应在 2h 内完成，因此 PRINS 是检测非整倍体可供选择的、非常有效的方法之一[35,36]。

2.9 彩色显带

彩色显带也称为跨物种 FISH（RxFISH），因为该方法应用流式分选的长臂

猿染色体经 PCR 扩增后的 DNA 文库[19]。长臂猿基因组（*Hylobates concolor* 和 *Hylobates syndactylus*）与人类基因组 DNA 有高度同源性，而且大多为重排染色体。用一套 FITC、Cy3 和 Cy5 组合标记的长臂猿 DNA 探针与正常人中期分裂相进行杂交，人类染色体就会显示出独特的彩色带型。利用商业化探针的彩色显带方法已用于肿瘤细胞遗传学研究[37]。

2.10 多重亚端粒探针 FISH

多重亚端粒探针 FISH 技术利用含人类 24 条不同染色体的 41 个亚端粒探针（不包括近端着丝粒染色体的短臂）的装置来实现[20]。每个探针包含人类染色体亚端粒区域（染色体末端 300kb 区域）内 100～200kb 的单拷贝序列[38]。将染色体短臂和长臂探针分别标记为绿色和红色，一次杂交就可以观察到所有染色体亚端粒区域的微小缺失或微小易位，因此可作为筛查的一种工具。

2.11 纤维 FISH

纤维 FISH 是将 DNA 探针与标本上伸展的染色质纤维（如裂解细胞释放出来的染色质）进行杂交的技术[11]。一种改进的方法是将探针与包埋在脉冲场凝胶电泳凝胶块中的细胞未固定的 DNA 纤维进行杂交[12]。该方法已用于高分辨的基因定位[11,12]、基因复制和易位涉及的染色体断裂点[39,41]的直接观察。

2.12 免疫表型和 FISH 的联合分析

FICTION 是“荧光免疫表型和间期细胞遗传学分析作为肿瘤研究的工具”的英文缩写，最初用来描述免疫表型和 FISH 的联合分析技术[42]。FICTION 可同时分析细胞表面免疫标志物和间期 FISH，免疫表型和 FISH 技术相结合的策略使得感兴趣的染色体畸变与肿瘤细胞的谱系和分化阶段相关联，从而为白血病和淋巴瘤的研究提供一个有用的工具[43,44]。

2.13 芯片、荧光基因分型和其他分子方法

为了描述染色体病和筛查亚显微的基因组改变已经建立了许多其他分子方法。基于 PCR 的微卫星 CA 重复序列分析和甲基化研究已常规用于检测单亲二倍体和印迹[45]。微卫星标记物已经用于全基因组染色体畸变的筛查[46]。最近建立的荧光基因分型技术可用来筛查亚端粒重排[47]。组织芯片[48]、CGH 芯片[21,49]和 cDNA 芯片[22]技术正在迅速发展，并用于包括分子细胞遗传学在内的

许多生物医学研究领域。

3. FISH 技术的应用

3.1 分析染色体结构异常

在出生的婴儿中，400 条 G 显带分辨率水平观察到的组成性结构染色体结构异常的发生率大约为 1/200，其中，所有新出现的平衡染色体异常为 1/1000，遗传性平衡染色体异常为 1/400，所有新出现的非平衡染色体异常为 1/1000，以及遗传性非平衡染色体异常为 1/2000[50]。遗传性染色体异常通常可以通过染色体带型特征和父母染色体分析确定，FISH 方法对鉴别和描述包括标记染色体在内的大多数新出现的不平衡结构重排是必需的。已经发现在白血病、淋巴瘤和实体瘤中导致染色体物质获得或丢失的大量获得性染色体畸变。确定染色体畸变是否涉及特定的染色体区域或特定基因是非常重要的，因为借此可以做出正确的临床诊断，并进行适当的治疗。然而对于许多病例而言，不用 FISH 或其他分子方法分析，做出正确诊断和进行适宜治疗是不可能的。

染色体涂染[51～53]、SKY[27～31]、M-FISH[54]、CGH[33,34]、彩色显带[37]等均已和 G 显带联合用于有关结构异常的研究中。然而在许多病例中，特定序列 FISH 技术在确定结构异常涉及基因中是必需的。实例之一就是急性髓细胞性白血病的染色体易位（断裂点在 11q23）涉及 *MLL* 基因的重排[55,56]。然而，依据疾病性质和特定的染色体畸变，可能需要采取综合性分子细胞遗传学分析策略[57～59]。

3.2 分析微缺失综合征

在过去的 20 年中，已经发现 30 多种微缺失综合征[7,60]。Williams 综合征、Prader-Willi/Angelman 综合征、Smith-Magenis 综合征、22q11.2 缺失和 1p36 缺失综合征是最常见的微缺失综合征。这些综合征通常是由 2～4Mb DNA 的缺失引起的，常规染色体分析无法检测到。因为缺失的染色体片段可能包含几个功能基因，采用“相邻基因综合征”描述这些综合征。一些综合征和精神疾病与 22q11.2 缺失有关，包括 DiGeorge 综合征、颌心面综合征（velocardiofacial）、先天性异常面容综合征（conotruncal anomaly face syndrome）以及精神分裂症患病危险性增高。最近，这些疾患被认为是同一遗传缺陷的不同表现[61]。在普通人群中，22q11.2 缺失的发病率约为 1/4500[62,63]。1p36 缺失为第二常见微缺失，在新生儿中发生率约为 1/10 000 以上[64]。因此总体上微缺失综合征的新生儿发病率可能在 1/2000～1/1000 或更高，因为越来越多的微缺失综合征被发现，

而且大多在临床上很难识别。假如微缺失综合征发病率在1‰，一个人同时患两种不同微缺失综合征的危险性为1/106，这样的病例确实报道过[65]。

通过提高染色体制备的质量，用G显带方法可以很容易地检测出Smith Magenis综合征的17p11.2缺失[66]。但对大多数微缺失综合征，不用FISH分析根本无法确诊。对微缺失综合征的研究提出了新的概念，如单亲二倍体、基因组印迹；同时在人类遗传学和医学遗传学研究中开拓了新的热点领域。反过来，从微缺失综合征研究中得到的新知识已经建立了Prader-Willi和Angelman综合征联合诊断方法。例如，常规染色体核型分析排除结构性异常，FISH方法检测微缺失，DNA分析单亲二倍体或基因突变[45]。

在不同实验室对微缺失综合征的FISH检出率可能是不同的，下面引用我们实验室的资料作为应用FISH诊断微缺失综合征的实例。从1996～2000年年底，共收到550个血样标本进行常见微缺失分析。用FISH方法确诊59例微缺失综合征（10.73%），其中37/300（12.33%）为22q11.2缺失、10/167（6%）为Prader-Willi/Angelman综合征、11/73（15%）为Williams综合征以及1/10（10%）为Miller-Dieker综合征。在我们实验室只有在常规染色体分析结果与临床表现不一致时才对Smith-Magenis综合征进行FISH分析。虽然一般认为1p36缺失是第二种常见的微缺失综合征，但是，在我们实验室的检测中还未见到此种缺失的病例。这也许反映出临床上认识此种综合征的难度，或简单地反映当地临床医生对这种综合征的认识水平。

3.3 检测不明原因智力障碍患者的染色体亚端粒区域畸变

亚端粒区域的基因组改变似乎是导致发育缺陷的重要原因[67]。据文献报道，亚端粒异常可能是导致智力障碍的第二个常见原因，仅次于21三体综合征[68]，用多重亚端粒探针FISH方法已研究了不明原因智力障碍或发育缺陷的患者。早期Kinght等的大规模研究报道[69]中，7.4%的中度至重度原发性智力障碍患者可以检测到亚端粒区域的染色体畸变。我们最近的研究[70]和其他两个大规模的研究[71,72]估计具有临床意义的亚端粒染色体畸变占研究人群的3%～5%。认为应用多重亚端粒FISH是确诊不明原因智力障碍和发育缺陷患者的有价值的方法[70]。

3.4 常见非整倍体产前诊断的间期FISH

染色体13、18、21、X和Y的非整倍体约占造成新生儿出生缺陷的染色体畸变的95%。为了建立、完善和评估采用未培养的羊水细胞间期FISH进行这些常见非整倍体的产前诊断，在过去的15年中进行了广泛深入的研究[8,9,73,74]。

在20世纪90年代后期DNA探针和FISH操作步骤已经商业标准化。目前应用的AneuVysion试剂盒（Vysis，Inc.，Downers Grove，IL）包括两套多色探针混合物，一套是13号和21号染色体探针，另一套是18号染色体、X染色体和Y染色体探针。已证实标准化的探针和操作步骤对常见非整倍体产前诊断是准确和非常灵敏的。对超声或妊娠母亲血液筛查提示高危险妊娠，FISH方法尤其有价值[75]。

自从1998年以来，我们实验室常规对妊娠晚期（≥20周）查出高危险妊娠的患者进行快速间期FISH产前诊断，例如，妊娠母亲血液筛查18号染色体或21号染色体三体阳性，或者超声异常提示可能染色体异常，用AneuVysion试剂盒进行FISH分析，并将结果反馈给医生。在分析的196个病例中，发现39例为非整倍体（15.3%），包括12例21三体、10例18三体、2例13三体、2例为45,X和2例为三倍体。所有的FISH结果经常规G显带证实（100%准确率，假阳性和假阴性为零）。用间期FISH进行产前诊断对这些患者是非常有益的，应成为常规的标准诊断方法。

3.5 应用母亲血液的染色体病产前诊断

在妊娠期进入母亲血液循环的胎儿有核红细胞提供一种非创伤性产前遗传学诊断的细胞来源。胎儿细胞FISH有可能成为染色体病产前诊断的有效方法，但需要从母亲血液中分离相当纯的胎儿细胞[76]。许多分离、富集和鉴定胎儿细胞方法，包括密度梯度离心、磁活化细胞分类、胎儿细胞培养、免疫细化染色等已经建立[77~80]。目前，无创伤性产前遗传学诊断方法仍旧在探索阶段。但是一种细胞分类、免疫表型和FISH相结合的途径似乎提高了方法的灵敏度和特异性，因此为未来的无创伤性产前遗传学测定带来了一种新的希望。

3.6 常见非整倍体的植入前诊断

植入前诊断是对体外受精（IVF）患者的妊娠前遗传学检测。大部分IVF患者的年龄在35岁及35岁以上。据估计这些患者中约50%的胚胎是染色体非整倍体为主的异常[82]。因为大多非整倍体是来源于母亲的减数分裂I期不分离造成的，因此对成熟和受精后从卵母细胞分离出来的第一极体和（或）第二极体进行FISH分析可以检测出这些非整倍体。在极体的FISH分析中最常用的DNA探针是13号、18号和21号染色体探针[82~85]。活检的胚胎发育早期单卵裂球FISH可以检测许多其他染色体[86~88]。非整倍体的植入前诊断为防止IVF高龄母亲与年龄有关的非整倍体的出现提供了一个准确可靠的方法[84,85]。选择具有正常染色体组成的胚胎同样可以提高高龄母亲或异常染色体核型携带者的植入

概率[88]。

3.7 嵌合现象及其对人类发育早期效应的研究

最近，染色体嵌合现象及其对人类发育早期效应的分子细胞遗传学研究代表研究的热点领域。组成性嵌合现象是受精后有丝分裂发生错误的结果，即体细胞事件。在确定三体细胞系多余染色体的来源时采用的分子研究中显示出了两种嵌合现象，即减数分裂嵌合现象和体细胞嵌合现象。减数分裂嵌合现象涉及在三体胚胎中产生二倍体细胞系的有丝分裂错误；体细胞嵌合现象在最初的二倍体胚胎中发生三体细胞系[89]。已常用到的其他术语还包括普遍意义上的嵌合现象或限定范围的嵌合现象。普遍意义上的嵌合现象涉及孕体的所有细胞谱系，包括胎盘和胚胎/胎儿组织。嵌合现象仅发生在胎盘中被称为限定于胎盘的嵌合现象。应用 FISH、CGH 和其他分子技术的研究已加深了对早期胚胎发育阶段染色体嵌合现象的生物学和临床意义的了解[89~92]。

3.8 检测人类肿瘤的特定易位和基因重排

在血液肿瘤、恶性淋巴瘤和实体瘤中已鉴定出有 100 多种重复发生的染色体易位，这些易位大多涉及特定基因的重排[93]，FISH 是详细描述这些易位的有效工具。临床上，鉴别分析特定的染色体易位和基因重排不仅有诊断意义，而且对于确定治疗方案、监测治疗效果和预测预后也是非常重要的。对于慢性髓细胞性白血病，研究表明间期 FISH 对检测 *BCR/ABL* 基因融合是非常灵敏的，因此对于追踪患者的治疗效果也是非常有用的[94~96]。在许多急性白血病涉及的特定基因分析中。例如，11q23 重排中涉及的 *MLL* 基因[55,56]、儿童急性淋巴细胞性白血病[97,98] *TEL/AML1* 融合，FISH 分析也是必要手段。检测非何杰金氏淋巴瘤多个重排基因的 FISH 探针已经商业化。研究表明用跨断裂点探针间期 FISH 分析囊性淋巴瘤 *BCL2* 基因重排优于标准的 PCR 方法[99]。在实体瘤中已发现许多特定的染色体重排和基因重排。在福尔马林中固定、石蜡包埋的肿瘤组织中用双色间期 FISH 能检测到这些重排。例如，滑液肉瘤的易位 t(X;18)(p11.2;q11.2)和尤因肉瘤（Ewing sarcoma）/末梢原始神经外胚层肿瘤（peripheral primitive neuroectodermal tumor）*EWS/FLI1* 基因融合[100,101]。显然用间期 FISH 检测实体瘤特定基因重排对于诊断和治疗有潜在的意义，但是对于临床实验室来说需要各种各样的商业化 FISH 探针。

3.9 分析肿瘤染色体或染色体区域的 DNA 获得和丢失

由于实体瘤细胞培养和染色体制备的困难以及肿瘤基因组改变的复杂性，使

得常规细胞遗传学分析受到限制。对任何来源的组织或细胞，如黏着组织、肿瘤冰冻切片、石蜡包埋组织[102,103]，不需要细胞培养，间期 FISH 就可以分析染色体的非整倍体。同样，几乎所有类型的临床标本可用作肿瘤的 CGH 研究[33]。许多报道表明某条染色体或染色体区域的获得或丢失与特定肿瘤、不同的肿瘤阶段和患者预后有关[104~107]。这些研究为我们理解实体瘤的生物学特性提供了极其重要的信息。

3.10 抑癌基因缺失和原癌基因扩增的分析

采用 FISH 或 CGH 对肿瘤组织分析能检测抑癌基因 *P53* 和 *RB-1* 的缺失以及原癌基因 *N-myc*、*C-myc* 和 *HER-2/neu* 的扩增。FISH 可以对成神经细胞瘤 *N-myc* 扩增进行可靠估计。在分析速度、技术简单程度、对同一标本肿瘤细胞异源基因扩增的分辨能力以及 *N-myc* 信号的扩增来源的确定能力方面，FISH 技术优于 Southern 杂交[108]。当 *N-myc* 扩增的细胞少或肿瘤内部异源基因存在时，在检测 *N-myc* 扩增方面间期 FISH 比 Southern 杂交更加准确[109]。另外，FISH 研究还表明 1p 异常与 *N-myc* 扩增的高度有关[110]。用 FISH 方法已经在许多种肿瘤中发现 *C-myc* 原癌基因的扩增，这些肿瘤包括成神经管细胞瘤、恶性黑色素瘤、肺癌、鼻咽癌、卵巢癌和前列腺癌。由于它与更具扩散性的临床和病理学特征有关，因此对乳腺癌患者的 *HER-2/neu* 基因（也被称为 *erb-2* 基因）的检测对患者的治疗措施是非常重要的。用 FISH、PCR 或免疫组织化学方法都能测定 *HER2/neu* 的扩增和（或）过度表达。最近的一些研究比较了 FISH 和免疫组织化学方法，结果表明两种方法的组合使检测更加灵敏和经济有效[114~116]。在人类肿瘤中已测定了其他许多原癌基因的情况，并且已知在某些肿瘤中有多个原癌基因扩增。用 CGH 芯片可以同时检测多个原癌基因拷贝数的改变[21,49]，用组织芯片可以快速分析大量的肿瘤组织标本。

3.11 组成性改变和获得性改变的全基因组筛查

如上所述，非平衡组成性改变或体细胞获得性改变可以通过一次 CGH 试验进行筛查，但分辨率受到限制。CGH 芯片技术为 DNA 拷贝数改变提供了高分辨率的筛查手段[21]。为了鉴别全基因组的基因扩增和缺失已经建立 cDNA 芯片 CGH 方法[22]。在最近的一份研究报告中指出，分辨率达到将近 1Mb 的 CGH 芯片已经成功应用于基因组分析，表明此方法灵敏度高，可以鉴别出单个拷贝数的获得和丢失[49]。亚显微染色体畸变也可以用全基因组微卫星标志物进行筛查[46]，现已表明自动化微卫星荧光基因型分析是筛查端粒区域微小重排的非常灵敏的方法[47]。

4. 临床应用标准和指南

每个细胞遗传学实验室必须根据专业委员会提供的指南，建立他们自己的为分子细胞遗传学技术临床应用的操作程序和标准。一些新技术的引入和临床应用资料的积累，使得标准和指南的修订也非常重要。在北美洲，由美国人类遗传学会（ASHG）、美国医学遗传学学院（ACMG）和加拿大医学遗传学学院(CCMG)提供遗传检测的指导原则。

1993年，在强调检测的探索性质时，ACMG认识到产前间期FISH具有诊断前景[117]。ACMG 1996年提供了包括临床适应证、检测合法化要求、分析标准和FISH研究报告指南[118]，并在1999年修订[119]。1997年CCMG也给加拿大细胞遗传学实验室提供了FISH技术临床应用的指导原则[120]，这与ACMG在政策上基本一致。ASHG/ACMG检测和技术转让联合委员会在1996年发表了对Prader-Willi综合征和Angelman综合征的一个有关实验诊断性检测的报告，该报告涉及FISH技术在内的推荐检测技术[45]。最近，该委员会发表了ACMG/ASHG在FISH技术和临床评估的职责声明[121]，在声明中推荐："FISH检测是诊断微缺失综合征和识别基因组中未知材料的一种非常有效和准确的方法。对于用常规细胞遗传学检测不到而用FISH检测能够提供结果的疾病，我们应当接受FISH结果的独立可靠性"。

5. 结论

作为研究工具，分子细胞遗传学有助于理解人类生物学的许多方面，而且在人类基因组定位中起到不可替代的作用（在此综述中无涉及）。作为诊断工具，分子细胞遗传学现已成为医学实践许多领域的必要组成部分，这些领域包括医学遗传学、围产医学、儿科学、生殖医学、病理学、血液学、肿瘤学和精神病学。

我们已经经历了人类基因组计划和分子细胞遗传学发展的令人振奋的年代。2003年人类基因组的高质量测序已经完成，我们将进入后基因组时代。当我们思索由人类基因组计划导致医学实践可能的未来变化，不容置疑的是FISH技术在医学科研领域的应用将会更加广泛和深入、许多新技术将被发明。在新世纪里，人类染色体的色彩将会更加丰富，分子细胞遗传学学科将会继续繁荣。

（刘青杰 译，陈德清　范耀山 校）

参 考 文 献

1. Pinkel, D., Straumer, T., and Gray, I. W. (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence *in situ* hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83,** 2934–2938.
2. Lawrence, J. B., Villnave, C. A., and Singer, R. H. (1988) Sensitive, high-resolution chromatin and chromosome mapping *in situ*: presence and orientation of two closely integrated copies of EBV in a lymphoma line. *Cell* **52,** 51–61.
3. Fan, Y. S., Davis, L. M., and Shows, T. B. (1990) Mapping small DNA sequences by fluorescence *in situ* hybridization directly on banded metaphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87,** 6223–6227.
4. Lichter, P., and Ward, D. C. (1990) High resolution mapping of human chromosome 11 by *in situ* hybridization with cosmid clones. *Science* **247,** 64–69.
5. Pinkel, D., Landegent, C., Collins, C., et al. (1988) Fluorescence *in situ* hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85,** 9138–9142.
6. Blennow, E., Anneren, G., Bui, T-H., Berggren, E., Asadi, E., and Nordenskjold, M. (1993) Characterization of supernumerary ring marker chromosomes by fluorescence *in situ* hybridization. *Am. J. Hum. Genet.* **53,** 433–442.
7. Ledbetter, D. H. and Ballabio, A. (1995) Molecular cytogenetics of continuous gene syndromes: mechanisms and consequences of gene dosage imbalances, in *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases,* 7th ed (Scriver, C. R., Beaudet, A., Sly, W., and Valle, D., eds.), McGraw Hill, New York, pp. 811–839.
8. Klinger, K., Landes, G., Shook, D., et al. (1992) Rapid detection of chromosome aneuploidies in uncultured amniocytes by using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Am. J. Hum. Genet.* **51,** 55–65.
9. Ward, B. E., Gersen, S. L., Carelli, M. P., et al. (1993) Rapid prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies by fluorescence *in situ* hybridization: clinical experience with 4,500 specimens. *Am. J. Hum. Genet.* **52,** 954–865.
10. Koch, J., Kovarra, S., Gregersen, N., Petersen, K. B., and Bolund, L. (1989) Oligonucleotide-priming methods for the chromosome-specific labeling of alpha satellite DNA *in situ*. *Chromosoma* **98,** 259–262.
11. Heng, H. H. Q., Squire, J., and Tsui, L.-C. (1992) High resolution mapping of mammalian genes by *in situ* hybridization to free chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89,** 9509–9513.
12. Heiskanen, M., Hellsten, E., Kallioniemi, O.-P., et al. (1995) Visual mapping by fiber-FISH. *Genomics* **30,** 31–36.
13. Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. P., Suder, D., et al. (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* **258,** 818–821.
14. Su, Y., Trent, J., Guan, X. Y., and Meltzer, P. (1994) Direct isolation of genes encoded within a homogeneously staining region by chromosome microdissection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91,** 9121–9125.
15. Guan, X. Y., Meltzer, P., Dalton, W., and Trent, J. (1994) Identification of cryptic sites of DNA sequence amplification in human breast cancer by chromosome microdissection. *Nat. Genet.* **8,** 155–160.
16. Schröck, E., du Manoir, S., Veldman, T., et al. (1996) Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* **273,** 494–497.
17. Speicher, M. R., Ballard, S. G., and Ward, D. C. (1996) Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat. Genet.* **12,** 368–375.
18. Eils, R., Uhring, S., Saracoglu, K., et al. (1998) An optimized, fully automated system

for fast and accurate identification of chromosome rearrangements by multiplex-FISH (M-FISH). *Cytogenet. Cell Genet.* **82,** 160–171.
19. Müller, S., Rocchi, M., Ferguson-Smith M. A., and Wienberg, J. (1997) Toward a multicolor chromosome bar code for the entire human karyotype by fluorescence *in situ* hybridization. *Hum. Genet.* **100,** 271–278.
20. Knight, S. J. L., Horsley, S. W., Regan, R., et al. (1997) Development and clinical application of an innovative fluorescence *in situ* hybridization technique which detects submicroscopic rearrangements involving telomeres. *Eur. J. Hum. Genet.* **5,** 1–8.
21. Pinkel, D., Segraves, R., Sudar, D, et al. (1998) High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat. Genet.* **20,** 207–211.
22. Pollack, J. R., Perou, C. M., Alizadeh, A. A., et al. (1999) Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat. Genet.* **23,** 41–46.
23. Cremer, T., Lichter, P., Borden, J., Ward, D. C., and Manuelidis, L. (1988) Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by *in situ* hybridization using chromosome-specific library probes. *Hum. Genet.* **80,** 235–246.
24. Lichter, P., Ledbetter, S. A., Ledbetter, D. H., and Ward, D. C. (1990) Fluorescence *in situ* hybridization with ALU and Li polymerase chain reaction probes for rapid characterization of human chromosomes in hybrid cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85,** 9138–9142.
25. Guan, X. Y., Meltzer, P., and Trent, J. (1994) Rapid generation of whole chromosome painting probes (WCPs) by chromosome microdissection. *Genomics* **22,** 101–107.
26. Joyce, C. A., Ross, F. M., Dennis, N. R., Wyre, N. D., and Barber, J. C. (1999) Multipaint FISH: a rapid and reliable way to define cryptic and complex abnormalities. *Clin. Genet.* **56,** 192–199.
27. Veldman, T., Vignon, C., Schröck, E., Rowley, J. D., and Ried, T. (1997) Hidden chromosome abnormalities in hematological malignancies detected by multicolor spectral karyotyping. *Nat. Genet.* **15,** 406–410.
28. Sawyer, J. R., Lukacs, J. L., Munshi, N., et al. (1998) Identification of new nonrandom translocations in multiple myeloma with multicolor spectral karyotyping. *Blood* **92,** 4269–4278.
29. Rowley, J. D., Reshmi, S., Carlson, K., and Roulston, D. (1999) Spectral karyotype analysis of T-cell acute leukemia. *Blood* **93,** 2038–2042.
30. Schröck, E., Veldman, T., Padilla-Nash, H., et al. (1997) Spectral karyotyping refines cytogenetic diagnosis of constitutional chromosomal abnormalities. *Hum. Genet.* **101,** 255–262.
31. Huang, B., Ning, Y., Lamb, A. N., Sandlin, C. J., Jamehdor, M., Ried, T., and Bartley, J. (1998) Identification of an unusual marker chromosome by spectral karyotyping. *Am J. Med. Genet.* **8,** 368–372.
32. Fan, Y. S., Siu, V.M, Jung, J. H., and Xu, J. (2000) Sensitivity of multiple color spectral karyotyping in detecting small interchromosomal rearrangements. *Genetic Testing* **4,** 9–14.
33. Weiss, M. M., Hermsen, M. A. J. A., Meijer, G. A., et al. (1999) Comparative genomic hybridization. *J. Clin. Pathol. (Mol. Pathol.)* **52,** 243–251.
34. Levy, B., Dunn, T. M., Kaffe, S., Kardon, N., and Hirschhorn, K. (1998) Clinical applications of comparative genomic hybridization. *Genet. Med.* **1,** 4–12.
35. Velagaleti, G. V. N., Tharapel, S. A., and Tharapel A. T. (1999) Validation of primed *in situ* labeling (PRINS) for interphase analysis: Comparative studies with conventional fluorescence *in situ* hybridization and chromosome analysis. *Cancer Genet. Cytogenet.* **108,** 100–106.

36. Pellestor, F., Andréo, B., and Coullin, P. (1999) Interphase analysis of aneuploidy in cancer cell lines using primed *in situ* labeling. *Cancer Genet. Cytogenet.* **111,** 111–118.
37. Zhao, L., Hayes, K., and Glassman, A. (2000) Enhanced detection of chromosomal abnormalities with the use of RxFISH multicolor banding technique. *Cancer Genet. Cytogenet.* **118,** 108–111.
38. Knight, S. J. L., Lese C. M., Precht, K. S., et al. (2000) An optimized set of human telomere clones for studying telomere integrity and architecture. *Am. J. Hum. Genet.* **67,** 320–332.
39. Vaandrager, J. W., Schuuring, E., Zwikstra, E., et al. (1996) Direct visualization of dispersed 11q13 chromosomal translocations in mantle cell lymphoma by multicolor DNA fluorescence *in situ* hybridization. *Blood* **88,** 1177–1182.
40. McDonell, N., Ramser, J., Francis, F., et al. (2000) Characterization of a highly complex region in Xq13 and mapping of three isodicentric breakpoints associated with preleukemia. *Genomics* **15,** 221–229.
41. Suto, Y., Ishikawa, Y., Hyodo, H., Uchikawa, M., and Juji, T. (2000) Gene organization and rearrangements at the human Rhesus blood group locus revealed by fiber-FISH analysis. *Hum. Genet.* **106,** 164–171.
42. Weber-Matthiesen, K., Winkemann, M., Müller-Hermelink, A., Schlegelberger, B., and Grote, W. (1992) Simultaneous fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics: A contribution to the characterization of tumor cells. *J. Histochem. Cytochem.* **40,** 171–175.
43. Takahashi, N., Miura, I., Saitoh, K., and Miura, A. B. (1998) Lineage involvement of stem cells bearing the Philadelphia chromosome in chronic myeloid leukemia in the chronic phase as shown by a combination of fluorescence-activated cell sorting and fluorescence *in situ* hybridization. *Blood* **92,** 4758–4763.
44. Zhang, Y., Wong, K. F., Siebert, R., Matthiesen, P., and Harder, S. (1999) Chromosome aberrations are restricted to the $CD56^+$, $CD3^-$, tumor cell population in natural killer cell lymphomas: A combined immunophenotyping and FISH study. *Br. J. Haematol.* **105,** 737–742.
45. American Society of Human Genetics/American College of Medical Genetics Test and Technology Transfer Committee (1996) Diagnostic testing for Prader-Willi and Angelman syndromes: Report of the ASHG/ACMG Test and Technology Transfer Committee. *Am. J. Hum. Genet.* **58,** 1085–1088.
46. Posenberg, M. J., Vaske, D., Killoran, C. E., et al. (2000): Detection of chromosomal aberration by a whole-genome microsatellite screen. *Am. J. Hum. Genet.* **66,** 419–427.
47. Colleaux, L., Rio, M., Heuertz, S., et al. (2000), A novel automated strategy for screening cryptic telomeric rearrangements in children with idiopathic mental retardation. *Am. J. Hum Genet.* **67,** Abstract 257.
48. Bubendorf, L., Kononen, J., Koivisto, P., et al. (1999), Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughput fluorescence *in situ* hybridization on tissue microarrays. *Cancer Res.* **59,** 803–806.
49. Snijders, A. M., Hindle, A. K., Segraves, R., et al. (2000), Quantitative DNA copy number analysis across the human genome with ~1 megabase resolution using array CGH. *Am. J. Hum. Genet.* **67,** Abstract 112.
50. Nora, J. J., Fraser, F. C., Bear, J., Greenberg, C. R., Patterson, D., and Warburton, D., ed. (1994) *Medical Genetics.* 4th ed, Lea and Febiger, Malvern, PA, p. 36.
51. Fan, Y. S., Rizkalla, K., and Barr, R. M. (1999) Complex rearrangement of chromosomes 1, 7, and 16 in chronic myelomonocytic leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* **112,** 190–192.

52. Fan, Y. S., Rizkalla, K., and Engel, J. (1999) Interstitial deletion of 8(q13q22) in diffuse large B-cell gastric lymphoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* **115,** 28–31.
53. Fan, Y. S., Rizkalla, K., Brien, F. W., and Engel, C. J. (2000) Jumping translocations of 11q in acute myeloid leukemia and 1q in follicular lymphoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* **118,** 35–41.
54. Jalal, S. M. and Law, M. E. (1999) Utility of multicolor fluorescent *in situ* hybridization in clinical cytogenetics. *Genet. Med.* **5,** 181–186.
55. Fleischman, E. W., Reshmi, S., Frenkel, M. A., et al. (1999) MLL is involved in a t(2;11)(p21;q23) in a patient with acute myeloblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* **24,** 151–155.
56. Aventín, A., La Starza, R., Martínez, C., et al. (1999) Involvement of MLL gene in a t(10;11)(q22;q23) and a t(8;11)(q24;q23) identified by fluorescence *in situ* hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.* **108,** 48–52.
57. Fan, Y. S., Jung, J., and Hamilton, B. (1999) Small terminal deletion of 1p and duplication of 1q: cytogenetics, FISH studies, and clinical observations at newborn and at age 16 years. *Am. J. Med. Genet.* **86,** 118–123.
58. Fan, Y. S., Rizkalla, K., and Barr, R. M. (1999) A new complex variant Philadelphia chromosome, t(1;9;22)ins(17;22), characterized by fluorescence *in situ* hybridization in an adult ALL. *Leuk. Res.* **23,** 1001–1006.
59. Fan, Y. S. and Siu, V. M. (2001) Molecular cytogenetic characterization of a derivative chromosome 8 with an inverted duplication of 8p21.3->p23.3 and a rearranged duplication of 8q24.13->qter. *Am. J. Med. Genet.* **102,** 266–271.
60. Shapira, S. K. (1998) An update on chromosome deletion and microdeletion syndromes. *Current Opinion in Pediatrics* **10,** 622–627.
61. Swillen, A., Vogels, A., Devriendt, K., and Fryns, J. P. (2000) Chromosome 22q11 deletion syndrome: update and review of the clinical features, cognitive-behavioral spectrum, and psychiatric complications. *Am. J. Med. Genet. (Semin. Med. Genet.)* **97,** 128–135.
62. Du Montcel, S. T., Mendizabal, H., Aymé, S., Lévy, A., and Philip, N. (1996) Prevalence of 22q11 microdeletion. *J. Med. Genet.* **33,** 719.
63. Devriendt, K., Fryns, J. P., Mortier, G., van Thienen, M. N., and Keymolen, K. (1998) The annual incidence of DiGeorge/velocardiofacial syndrome. *J. Med. Genet.* **35,** 789–790.
64. Shapira, S. K., McCaskill, C., Northrup, H., et al. (1997) Chromosome 1p36 deletions: The clinical phenotype and molecular characterization of a common newly delineated syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **61,** 642–650.
65. Fan, Y. S., Cairney, A. E., and Siu, V. M. (1997) Polyslenia and neutropenia in a patient with 22q11 deletion and trichorhinophalangeal syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **61,** Supplement A97.
66. Fan, Y. S. and Farrell, S. A. (1994) Prenatal diagnosis of interstitial deletion of 17(p11.2p11.2) (Smith-Magenis syndrome). *Am. J. Med. Genet.* **49,** 253–254.
67. Flint, J., Wilkie, A. O. M., Buckle, V. J., Winter, R. M., Holland, A. J., and McDermid, H. E. (1995) The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat. Genet.* **9,** 132–140.
68. Knight, S. J. L. and Flint, J. (2000) Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *J. Med. Genet.* **37,** 401–409.
69. Knight, S. J. L., Regan, R., Nicod, A., et al. (1999) Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet* **354,** 1676–1681.

70. Fan, Y. S., Yang, Z., Speevak, M., Farrell, S., Jung, J. H., and Siu, V. M. (2001) Detection of subtelomeric aberrations in patients with unexplained mental retardation by FISH using multiple subtelomeric probes. *Genetics in Medicine* **20(6),** 2001. **3(6),** 416–421.
71. Vorsanova S. G., Koloti D., Sharonin V. O., Sloviev V., and Yurov Y. B. (1998) FISH analysis of microaberrations at telomeric and subtelomeric regions in chromosomes of children with mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* **63(suppl),** A169.
72. Ballif, B. C., Kashork, C. D., and Shaffer, L. G. (2000) The promise and pitfalls of telomere region-specific probes. *Am. J. Hum. Genet.* **67,** 1356–1359.
73. Eiben, B.,Trawicki, W., Hammons, W., Goebel, R., Pruggmayer, M., and Epplen, J. T. (1999) Rapid prenatal diagnosis of aneuploidies in uncultured amniocytes by fluorescence *in situ* hybridization. Evaluation of >3,000 cases. *Fetal Diagn. Ther.* **14,** 193–197.
74. Lewin, P., Kleinfinger, P., Bazin, A., Mossafa, H., and Szpiro-Tapia, S. (2000) Defining the efficiency of fluorescence *in situ* hybridization on uncultured amniocytes on a retrospective cohort of **27,**407 prenatal diagnosis. *Prenat. Diagn.* **20,** 1–6.
75. Feldman, B., Ebrahim, S. A. D., Hazan, S. L., et al. (2000) Routine prenatal diagnosis of aneuploidy by FISH studies in high-risk pregnancies. *Am. J. Med. Genet.* **90,** 233–238.
76. Steele, C. D., Wapner, R. J., Smith, J. B., Haynes, M. K., and Jackson, L. G. (1996) Prenatal diagnosis using fetal cells isolated from maternal peripheral blood: A review. *Clin. Obstet. Gynecol.* **39,** 801–813.
77. Valerio, D., Aiello, R., Altieri, V., Malato, A. P., Fortunato, A., and Canazio, A. (1996) Culture of fetal erythroid progenitor cells from maternal blood for noninvasive prenatal genetic diagnosis. *Prenat. Diagn.* **16,** 1073–1082.
78. Mavrou, A., Colialexi, A., Tsangaris, G. T., et al. (1998) Fetal cells in maternal blood: Isolation by magnetic cell sorting and confirmation by immunophenotyping and FISH. *In Vivo* **12,** 195–200.
79. Oosterwijk, J. C., Mesker, W. E., Ouwerkerk-van Velzen, M. C., et al. (1998) Development of a preparation and staining method for fetal erythroblasts in maternal blood: Simultaneous immunocytochemical staining and FISH analysis. *Cytometry* **32,** 170–177.
80. Al-Mufti, R., Hambley, H., Farzaneh, F., and Nicolaides, K. H. (1999) Investigation of maternal blood enriched for fetal cells: Role in screening and diagnosis of fetal trisomies. *Am. J. Med. Genet.* **85,** 66–75.
81. Yang, Y. H., Jee, K. J., Kim, S. K., et al. (2000) Prenatal genetic diagnosis from maternal blood: Simultaneous immunophenotyping and FISH of fetal nucleated erythrocytes isolated by negative and positive magnetic activated cell sorting. *Yonsei. Med. J.* **41,** 258–265.
82. Munne, S., Dailey, T., Sultan, K. M., Grifo, J., and Cohen, J. (1995) The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy. *Hum. Reprod.* **10,** 1014–1020.
83. Verlinsky, Y., Cieslak, J., Ivakhnenko, V., Lifchez, A., Strom, C., and Kuliev, A. (1996) Birth of healthy children after preimplantation diagnosis of common aneuploidies by polar body fluorescence *in situ* hybridization analysis. *Fertil. Steril.* **66,** 126–129.
84. Verlinsky, Y., Cieslak, J., Ivakhnenko, V., et al. (1998) Preimplantation diagnosis of common aneuploidies by the first- and second-polar body FISH analysis. *J. Assist. Reprod. Genet.* **15,** 285–289.
85. Verlinsky, Y., Cieslak, J., Ivakhnenko, V., et al. (1999) Prevention of age-related aneuploidies by polar body testing of oocytes. *J. Assist. Reprod. Genet.* **16,** 165–169.
86. Liu, J., Tsai, Y. L., Zheng, X. Z., et al. (1998) Feasibility study of repeated fluorescence *in situ* hybridization in the same human blastomeres for preimplantation genetic diagno-

sis. *Mol. Hum. Reprod.* **4,** 972–977.

87. Munne, S., Magli, C., Bahce, M., et al. (1998) Preimplantation diagnosis of the aneuploidies most commonly found in spontaneous abortions and live births: XY, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22. *Prenat. Diagn.* **18,** 1459–1466.
88. Gianaroli, L., Magli, M. C., Ferraretti, A. P., and Munne, S. (1999) Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: Identification of the categories for which it should be proposed. *Fertil. Steril.* **72,** 837–844.
89. Kalousek, D. K. (2000) Pathogenesis of chromosomal mosaicism and its effect on early human development. *Am. J. Med. Genet.* **91,** 39–45.
90. Lomax, B., Kalousek, D. K., Kuchinka, B., Barrett, I. J., Harrison, K.J, and Safavi, H. (1994) The utilization of interphase cytogenetic analysis for the detection of mosaicism. *Hum. Genet.* **93,** 243–247.
91. Lestou, V. S., Lomax, B., Barrett, I. J., and Kalousek, D. K. (1999) Screening of human placentas for chromosomal mosaicism using comparative genomic hybridization. *Teratology* **59,** 325–330.
92. Robinson, W. P., Barrett, I. J., Bernard, L., et al. (1997) Meiotic origin of trisomy in CPM is correlated with presence of fetal uniparental disomy, high levels of trisomy in trophoblast, and increased risk of fetal intrauterine growth restriction. *Am. J. Hum. Genet.* **60,** 917–927.
93. Block, A. W. (1999) Cancer Cytogenetics, in *The Principles of Clinical Cytogenetics*, (Gersen, S. L. and Keagle, M., B., eds.), Humana Press, Totowa, NJ, pp. 345–420.
94. Dewald, G. W., Wyatt, W. A., Junaeu, A. L., et al. (1998) Highly sensitive fluorescence *in situ* hybridization method to detect double BCR/ABL fusion and monitor response to therapy in chronic myeloid leukemia. *Blood* **91,** 3357–3365.
95. Buño, I., Wyatt, W. A., Zinsmeister, A. R., Dietz-Band, J., Silver, R. T., and Dewald, G. W. (1998) A special fluorescence *in situ* hybridization technique to study peripheral blood and assess the effectiveness of interferon therapy in chronic myeloid leukemia. *Blood* **92,** 2315–2321.
96. Dewald, G., Stallard, R., Alsaadi, A., et al. (2000) A multicenter investigation with D-FISH BCR/ABL1 probes. *Cancer Genet. Cytogenet.* **116,** 97–104.
97. Rafi, S. K., El Gebaly, H., and Qumsiyeh, M. B. (2000): ETV6/CBFA2 fusions in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with myeloid markers. *Diagn. Mol. Pathol.* **9,** 184–189.
98. Loh, M. L., Samson, Y., Motte, E., et al. (2000) Translocation (2;8)(p12;q24) associated with a cryptic t(12;21)(p13:q22) *TEL/AML1* gene rearrangement in a child with acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* **15,** 79–82.
99. Vaandrager, J. W., Schuuring, E., Raap, T., Phillippo, K., Kleiverda, K., and Kluin, P. (2000) Interphase FISH detection of BCL2 rearrangement in follicular lymphoma using breakpoint-flanking probes. *Genes Chromosomes Cancer* **27,** 85–94.
100. Yang, P., Hirose, T., Hasegawa, T., Hizawa, K., and Sano, T. (1998) Dual-color fluorescence *in situ* hybridization analysis of synovial sarcoma. *J. Pathol.* **184,** 7–13.
101. Kumar, S., Pack, S., Kumar, D., et al. (1999) Detection of EWS-FLI-1 fusion in Ewing's sarcoma/peripheral primitive neuroectodermal tumor by fluorescence *in situ* hybridization using formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Hum. Pathol.* **30,** 324–330.
102. Schofield, D. E. and Fletcher J. A. (1992) Trisomy 12 in pediatric granulosa-stromal cell tumors: demonstration by a modified method of fluorescence *in situ* hybridization on paraffin-embedded material. *Am. J. Pathol.* **141,** 1265–1269.

103. Xiao, S., Renshaw, A., Cibas, E. S., Hudson, T. J., and Fletcher, J. A. (1995) Novel fluorescence *in situ* hybridization approaches in solid tumors. *Am. J. Pathol.* **147,** 896–904.
104. Blough, R. I., Heerema, N. A., Ulbright, T. M., Smolarek, T. A., Roth, L. M., and Einhorn, L. H. (1998) Interphase chromosome painting of paraffin-embedded tissue in the differential diagnosis of possible germ cell tumors. *Med. Pathol.* **11,** 634–641.
105. Wettengel, G. V., Draeger, J., Kiesewetter, .F, Schell, H., Neubauer, S., and Gebhart, E. (1999) Differentiation between Spitz nevi and malignant melanomas by interphase fluorescence *in situ* hybridization. *Int. J. Oncol.* **14,** 1177–1183.
106. Brown, J.A, Slezak, J. M., Lieber, M. M., and Jenkins, R. B. (1999) Fluorescence *in situ* hybridization aneuploidy as a predictor of clinical disease recurrence and prostate-specific antigen level 3 years after radical prostatectomy. *Mayo Clin. Proc.* **74,** 1214–1220.
107. Perlman, E. J., Hu, J., Ho, D., Cushing, B., Lauer, S., and Castleberry, R. P. (2000) Genetic analysis of childhood endodermal sinus tumors by comparative genomic hybridization. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* **22,** 100–105.
108. Shpiro, D. N., Valentine, M. B., Rowe, S. T., et al. (1993) Detection of *N-myc* gene amplification by fluorescence *in situ* hybridization: Diagnostic utility for neuroblastoma. *Am. J. Pathol.* **142,** 1339–1346.
109. Tajiri, T., Shono, K., Fujii, Y., et al. (1999) Highly sensitive analysis for *N-myc* amplification in neuroblastoma based on fluorescence *in situ* hybridization. *J. Pediatr. Surg.* **34,** 1615–1619.
110. Komuro, H., Valentine, M. B., Rowe, S. T., Kidd, V. J., Makino, S., Brodeur, G. M., Cohn, S. L., and Look, A. T. (1998) Fluorescence *in situ* hybridization analysis of chromosome 1p36 deletion in human MYCN amplified neuroblastoma. *J. Pediatr. Surg.* **33,** 1695–1898.
111. Jacobs, T. W., Gown, A. M., Yaziji, H., Barnes, M. J., and Schnitt, S. J. (1999) Comparison of fluorescence *in situ* hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **17,** 1974–1982.
112. Jimenez, R. E., Wallis, T., Tabasczka, P., and Visscher, D. W. (2000) Determination of Her-2/Neu status in breast carcinoma: Comparative analysis of immunohistochemistry and fluorescence *in situ* hybridization. *Mod. Pathol.* **13,** 37–45.
113. Pauletti, G., Dandekar, S., Rong, H., et al. (2000) Assessment of methods for tissue-based detection of the *HER-2/neu* alteration in human breast cancer: A direct comparison of fluorescence *in situ* hybridization and immunohistochemistry. *J. Clin. Oncol.* **18,** 3651–3664.
114. Hoang, M. P., Sahin, A. A., Ordonez, N. G., and Sneige, N. (2000) HER-2/neu gene amplification compared with *HER-2/neu* protein overexpression and interobserver reproducibility in invasive breast carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* **113,** 852–859.
115. Wang, S., Saboorian, M. H., Frenkel, E., Hynan, L., Gokaslan, S. T., and Ashfaq, R. (2000) Laboratory assessment of the status of *Her-2/neu* protein and oncogene in breast cancer specimens: Comparison of immunohistochemistry assay with fluorescence *in situ* hybridization assays. *J. Clin. Pathol.* **53,** 374–381.
116. Ridolfi, R. L., Jamehdor, M. R., and Arber, J. M. (2000) *HER-2/neu* testing in breast carcinoma: A combined immunohistochemical and fluorescence *in situ* hybridization approach. *Mod. Pathol.* **13,** 866–873.
117. American College of Medical Genetics (1993) Prenatal interphase fluorescence *in situ* hybridization (FISH) policy statement. *Am. J. Hum. Genet.* **635,** 526–527
118. American College of Medical Genetics (1996) *Standards and Guidelines for Clinical*

Genetics Laboratories. Bethesda, MD.
119. American College of Medical Genetics (1999) *Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories*, 2nd ed. Bethesda, MD. Also at www.faseb.org/genetics/acmg.
120. The CCMG Cytogenetics Committee [Côté, Dallaire, Fan, Horsman, Kalousek, Tomkins, Roland (Chair)] (1997) CCMG position statement on the clinical application of fluorescence *in situ* hybridization. *CCMG Newsletter* 1997 **(3),** pp. 3–6.
121. Test and Technology Transfer Committee (2000) Technical and clinical assessment of fluorescence *in situ* hybridization: An ACMG/ASHG position statement. I. Technical considerations. *Genet. Med.* **2,** 358–361.

第 2 章　基因组靶序列荧光原位杂交探针的标记

Larry E. Morrison, Ramesh Ramakrishnan,
Teresa M. Ruffalo, Kim A. Wilber

1. 引言

荧光原位杂交（FISH）需要核酸探针，包括直接用荧光素标记或者可以间接与荧光素相连接的脱氧核糖核酸（DNA）、核糖核酸（RNA）或核酸类似物。通过探针核苷酸与靶序列的核苷酸互补配对，使得 FISH 分析具有特异性。核酸连接的荧光基团使得在荧光显微镜下可观察到细胞结构中的同源区域。摄影照相或电子照相可获得永久性荧光染色图像，而且后者可以进行探针荧光的定量测定。

本章介绍了许多将 DNA 与荧光基团连接成 FISH 探针的方法，这些探针可直接检测基因组的靶序列。在对标记方法、荧光基团选择和探针 DNA 来源进行简单阐述后，本章列出了几种酶标记和化学标记 FISH 探针的详细操作步骤。

1.1　直接和间接荧光基团标记

荧光素可以通过化学耦合与核酸探针直接相连接，或者核酸与非荧光分子化学耦合，这些非荧光分子可以在杂交后与荧光物质结合。前者称之为“直接标记”，后者被叫做“间接标记”。间接标记中与核酸探针直接相连的分子一般为生物素或半抗原，如二硝基苯酚（DNP）或地高辛精。用半抗原或生物素标记的探针进行的原位杂交，在杂交后将标本与荧光基团标记的抗体或抗生物素共温育。因为每个抗体或抗生物素分子可以结合许多荧光基团，间接标记方法使得多个荧光基团分子与每个可直接相连的部分结合。而且，有时被称为“三明治”的更多轮的抗体结合，可以进一步增加结合的荧光基团数目。例如，如果山羊抗 DNP IgG 结合 DNP 标记的探针，第二轮用荧光基团标记的抗山羊 IgG 可以放大荧光信号。

除了结合多轮的抗生物素和（或）抗体辅助试剂，荧光染色的量可以通过抗生物素或抗体的酶联耦合物来增加。为了 FISH 中酶联耦合物的有效性，酶反应的荧光产物必须保留在探针结合点的附近区域。两种染色局部区域的方法，包括

产生可沉积的荧光产物（ELF reagent，Molecular Probes，Inc.，Eugene，OR）[1~3]，以及可共价结合邻近细胞物质的高反应性荧光化合物（CARD/TSA，NEN，Boston，MA）[4~6]。

虽然间接标记方法可以使荧光信号更强，但此方法需要结合抗体和抗生物素试剂的附加温育步骤。由于抗体和抗生物素蛋白质与玻片上外源性细胞物质和玻片本身的非特异性结合，荧光抗体引入的同时可增加背景。当用多色 FISH 同时分析数个不同的基因组靶序列，必须用不同的、光谱上无交叉、差别明显的荧光基团来鉴别每个靶序列。对于直接标记探针，这就意味着鉴别 *N* 个不同的靶序列需要找到 *N* 个光谱上差别明显的荧光标记。对于间接标记探针，不仅要选择 *N* 个不同的标记，而且需要 *N* 个不同的结合对（半抗原 抗体对或生物素 抗生物素对）来连接 *N* 个荧光标记。对非常短（如小于 70kb 的靶序列）的基因组靶序列，需要间接标记方法才能达到肉眼可辨的荧光染色。长的靶序列一般仅用直接标记就可达到目的。在科研中涉及的探针或特定靶序列可能很少用到或是在启动探索阶段，每个实验室可选择短靶序列探针（如质粒或黏粒克隆）进行间接标记。随着与人类基因组计划相关的人工细菌染色体（BAC）文库的成功构建，长靶序列探针的制备变得很容易，用直接标记探针进行分析也非常省事。

1.2 核酸标记化学概论

无论探针是直接标记或间接标记，核酸必须经过修饰才能与荧光基团、生物素或半抗原相连接。化学反应和酶促反应两种方式用于标记过程。早期 FISH 一般应用化学修饰探针，即 3′端核糖核苷经高碘酸盐氧化作用形成二醛，与荧光素的酰肼衍生物结合[7]。生物素或半抗原可能通过同样的化学过程。然而，该化学过程限于 RNA 探针或 DNA 探针，如用末端核苷酸转移酶将探针 3′端连接上核糖核苷。对原位杂交探针进行化学修饰的其他反应包括掺入半抗原乙酰胺基芴(aminoacetyl-fluorene，AAF)[8~12]、汞化处理[13]。汞标记探针在杂交后重新与含检测位点和巯基的双功能分子进行作用[14,15]。

下面将更加详细地阐述一种非常简便的、利用铂络合物的化学标记方法[16]。该方法中检测位点衍生化形成铂络合物的配位体。标记的络合物进一步与核酸反应使铂与核酸的鸟嘌呤残基形成配位共价键。其他用于标记探针的化学过程包括亚硫酸盐介导的胞嘧啶转氨基[17,18]，光生物素的光化学反应[19]，用 *N*-溴代琥珀酰亚胺胸腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶的溴化反应，随后与含胺的检测位点反应[20]，二氨基末端磷酸基团的浓缩，与氨基活化检测部分相连接[21,22]。

到目前为止，用聚合酶掺入标记的三磷酸核苷的酶促反应是核酸标记最常用的方法。在这些方法中，缺口平移掺入生物素化的三磷酸核苷是最早的、使用频率最高的方法[23~25]。用此方法掺入的半抗原包括乙酰胺基芴[26]、地高辛精[27]和

荧光素[28]。除用抗荧光素抗体作为间接标记外，缺口平移掺入荧光素已作为可直接检测的探针[26,28]。通过聚合酶掺入的、可通过FISH直接检测的各种荧光基团现已经商品化（如Molecular Probes Inc.，Eugene，OR；New England Nuclear，Boston，MA；或者Vysis，Inc.，Dowers Grove，IL）。

除缺口平移外，DNA聚合酶还可用于将标记的三磷酸核苷掺入FISH探针的PCR反应。包括用侧翼引物扩增质粒DNA插入片段[29]以及用随机引物和简并引物的聚合酶链反应（PCR）[30]。这些重要的酶促标记操作程序举例将在下面列出（见本章3.1～3.3）。

请注意杂交效果最好的原位杂交探针的大小为小于1kb，报道中的操作程序通常要求探针大小为200～600bp。使探针成为片段的方法有超声处理、碱处理、加热或酶降解；使用特定的酶促标记方法，如PCR也能制备较短长度的探针。

1.3 荧光基团的选择

从光谱的紫外一端到近红外激发波长范围内的一系列荧光基团，都可以用作原位杂交探针的标记。最常用的荧光基团属于几种常见化学物质：香豆素、荧光素、罗丹明和花青素。这些化合物以及两个常用于间接标记的化合物的结构见图1。改变结构中的取代基（R_n）就可以改变化学特性和光谱特性（包括光吸收的消光系数、荧光亮度、荧光寿命以及荧光激发和发射光谱）。例如，7-氨基-4-甲基香豆素-3-乙酸酯（AMCA；R_6＝氨基，R_3＝甲基，R_2＝乙酸盐，见图1结构式D）最大激发在354nm，最大发射在441nm。改变取代基形成7-二甲氨基香豆素-3-羧酸（R_6＝二甲氨基，R_2＝羧酸盐，见图1结构式D），使得最大激发在432nm，最大发射在472nm。对于罗丹明，罗丹明绿（R_7＝R_8＝R_9＝R_{10}＝氢，R_{11}或R_{12}为羧基，见图1结构式B）的最大激发在504nm，最大发射在532nm；而四甲基异硫氰酸罗丹明（TRITC，R_7＝R_8＝R_9＝R_{10}＝甲基，R_{11}或R_{12}为异硫氰酸）最大激发在544nm，最大发射在572nm。花青素的光谱特征很大程度取决于分离两个吲哚环的碳原子数目。例如，Cy3（在图1结构式C中m=1）的最大激发在550nm，最大发射在570nm；Cy5（在图1结构式C中m=2）的最大激发在649nm，最大发射在670nm。许多原位杂交探针标记的荧光基团最大激发和发射波长列于表1中，该表中同时列出了两种常见核酸复染剂：4′,6-二氨基-2-苯基吲哚（DAPI）和碘化丙锭（PI）的信息。

原位杂交中荧光基团最理想的特性是高吸收消光系数（最好大于10 000 $M^{-1}\cdot cm^{-1}$）和高荧光亮度（最好大于0.2）。激发光谱和发射光谱也是非常重要的，要根据激发光源的光谱分布、显微镜光学系统、荧光探测装置和可用的滤光片来选择。对于多靶序列的杂交，必须仔细选择分析中的每个荧光基团的光谱分布，以使每种荧光能够单独鉴别出来（有关多靶杂交的综述请参考文献31）。

图 1　4 种常见荧光基团种类（A～D）和两种常见间接标记化合物（E 和 F）的化学结构。A. 荧光素；B. 罗丹明；C. 花青素（只有 Cy3、Cy5 和 Cy7）；D. 香豆素；E. 生物素；F. 地高辛精。每一种类特定化合物的不同在于化学取代基，在化学结构中表示为 R's。

表 1　用于 FISH 的探针标记的荧光基团和复染剂

荧光基团	吸光度消光系数	峰值波长/nm	
		激发	发射
标记化合物			
香豆素			
7-氨基-4-甲基香豆素-3-乙酸酯，NHS	17 000	354	441
7-二乙氨-香豆素-3-羧酸酯，NHS	56 000	432	472
Pacific Blue™，NHS	36 000	416	451
荧光素			
5-或 6-羧基荧光素，NHS	83 000	496	516
5-或 6-异硫氰酸荧光素，NHS	80 000	494	519
异硫氰酸 Oregon Green® 488	78 000	493	520

续表

荧光基团	吸光度消光系数	峰值波长/nm	
		激发	发射
罗丹明			
羧酸罗丹明 Green™，NHS	78 000	504	532
Alexa Fluor® 488	71 000	494	519
Alexa Fluor® 532	81 000	530	555
Alexa Fluor® 546	104 000	554	570
Alexa Fluor® 568	91 000	577	602
Alexa Fluor® 594	85 000	590	615
四甲基异硫氰酸罗丹明	84 000	544	572
氯磺酸德克萨斯红®	85 000	587	602
花青素			
Cy2™	150 000	489	506
Cy3™	150 000	550	570
Cy3.5™	150 000	581	596
Cy5™	250 000	649	670
Cy5.5™	250 000	675	694
Cy7™	250 000	743	767
商业化探针的标记			
SpectrumBlue™		400	450
SpectrumAqua™		433	480
SpectrumGreen™		497	524
SpectrumGold™		530	555
SpectrumOrange™		559	588
SpectrumRed™		592	612
SpectrumFRed™		655	675
DNA 复染剂			
4′,6-二氨基-2-苯基吲哚（DAPI）		367	452
碘化丙锭（PI）		543	614

NHS 为 *N*-羟基丁二酯，Spectral 的信息来自提供商的材料。

在选择标记荧光基团时，光谱特性并不是必须考虑因素的全部，尤其是标记荧光基团的不同化学结构与各种细胞成分、细胞碎片、胞外基质和玻片表面产生不同水平的相互作用。因此，标本的背景染色主要取决于标记荧光素的化学结构。既然高度疏水的标记产物可降低探针的可溶性，并且增加一些细胞成分的光吸收，确定一种标记探针杂交效果的唯一途径是实际标记探针并与靶组织进行杂交。

1.4 探针 DNA 的来源

对于大多数 FISH 分析，通过培养细菌或酵母制备探针，这些细菌或酵母中含有需要克隆的序列。经细胞收获、裂解，从宿主染色体 DNA 和细胞物质中纯

化克隆DNA。含有感兴趣克隆的细菌一般生长在含抗菌素的选择培养基中，对于酵母而言，培养基中缺乏一种特定营养成分。细菌克隆DNA可以用几种常用方法制备，如碱性裂解或煮沸法[32]*,**。同时，提取DNA的试剂盒已经商品化。可提供这些试剂盒的公司包括：Qiagen，Inc.（Chatsworth，CA）、Stratagene（La Jolla，CA）、Gentra Systems，Inc.（Minneapolis，MN）。从人工酵母染色体（YAC）中制备FISH探针优先选择的方法是通过Alu-PCR**扩增插入片段。

携带长插入片段的载体[如黏粒、P1、P1噬菌体人工染色体（PAC）或BAC]，最适于制备单拷贝序列DNA同源的FISH探针，该探针应至少跨越40kb连续序列。高度重复序列（如在着丝粒或端粒附近的序列）探针可以用克隆有300～10 000bp插入片段的单一质粒制备。

鉴别克隆是否含有预期的靶序列有两种最常用的方法：①合适克隆文库的筛选；②用已知序列如特定基因mRNA，或克隆插入序列末端的未知序列，或标志序列位点（STS）在网络数据库中搜索，如NCBI的GenBank。

含有跨越特定染色体全长序列的全染色体涂染探针，最早从含整条染色体的噬菌体库和细菌库中制备[33,34]。这些文库的最终来源是流式分选的染色体。最近，流式分选染色体[35,36]或显微切割的染色体经DOP-PCR扩增来制备全染色体探针，不需要构建细菌库所需的中间步骤[30,38]。

2. 材料

2.1 缺口平移

1. 待标记的样品DNA，一般在50μL标记反应中含1μg DNA。
2. 荧光素标记的dUTP，工作液浓度为0.2mmol/L。
3. 0.3mmol/L dATP。
4. 0.3mmol/L dCTP。
5. 0.3mmol/L dGTP。
6. 0.3mmol/L dTTP。
7. 缺口平移酶混合物：将DNA聚合酶I和DNA酶I混合，如Promega（Madison，WI）提供的酶混合物。
8. 10×缺口平移缓冲液：500 mmol/L Tris-HCl pH7.2，100mmol/L

* 见纽约John Wiley and Sons出版，由Janssen K.编辑的《最新分子生物学实验指南》系列中的其他各卷。

** 见纽约John Wiley and Sons出版，由Boyle A.L.编辑的《最新人类遗传学实验指南》系列中的其他各卷。

$MgSO_4$，1mmol/L 二硫苏糖醇（DTT）。

9. 无核酸酶的水。

10. 15℃的温育装置。

11. 反应终止液：0.25mmol/L EDTA。

12. 3mol/L 乙酸钠，pH 5.5。

13. 70%乙醇。

14. 100%乙醇。

15. TE 溶液：10mmol/L Tris-HCl pH 7.5～8，1mmol/L EDTA。

16. Sephadex G-50 型离心柱：如 ProbeQuan™ G-50 spin columns（Amersham Pharmacia，Piscataway，NJ）。也可以用其他一些方法去除未掺入的核苷。

17. 小离心管。

18. 微型离心机。

19. 真空冷冻离心干燥器。

20. 微量移液器。

21. 移液管尖，最好消毒过的。

22. TAE 缓冲液：40mmol/L Tris-乙酸盐 pH 7.5～7.8，1mmol/L EDTA；或 TBE 缓冲液：45mmol/L Tris-硼酸盐 pH 8.0，1mmol/L EDTA。

23. 琼脂糖。

24. 电热板或微波炉。

25. 55℃水浴锅。

26. 微型水平电泳槽，附有铺胶板、梳子和电源。

27. DNA 分子质量参考，大小应包括 50～1000bp。

28. 10mg/mL 溴化乙锭（EB）。

29. 10×凝胶上样缓冲液：50%（*V*/*V*）甘油、100mmol/L EDTA、0.25%溴酚蓝。

30. 紫外透射仪和防紫外护目镜 。

31. 具有柯达 Wratten 红色滤光片 Polaroid 照相机和 667 型胶卷。

2.2 随机引物

1. 待标记的样品 DNA，一般在 50μL 标记反应中含 10ng～3μg。

2. 荧光基团标记的 dUTP，工作液浓度为 1mmol/L。

3. 10mmol/L dATP。

4. 10mmol/L dCTP。

5. 10mmol/L dGTP。

6. 10mmol/L dTTP。

7. 40U/mL Klenow 片段（如 Life Technologies，Gaithersburg，MD）。

8. 2.5×随机引物缓冲溶液：125mmol/L Tris-HCl pH6.8，12.5mmol/L $MgCl_2$，25mmol/L 2-巯基乙醇，750μg/mL 八核苷酸随机引物（Life Technologies）。

9. 无核酸酶的水。

10. 37℃的温育装置。

11. 沸水水浴锅。

12. 冰。

13. 反应终止液：0.25mmol/L EDTA。

14. 3mol/L 乙酸钠，pH 5.5。

15. 70%乙醇。

16. 100%乙醇。

17. Sephadex G-50 型离心柱（可选择的，依据去除未掺入核苷的方法本身的要求）。

18. 小离心管。

19. 微型离心机。

20. 真空冷冻离心干燥器。

21. 微量移液器。

22. 移液管尖，最好消毒过的。

2.3 DOP-PCR

1. 流式细胞仪分选的染色体（每个 PCR 反应需 500～1000 条染色体）。

2. 10×PCR 缓冲液 I（Applied Biosystems，Foster City，CA）。

3. PCR 分析溶液：10μL 10×PCR 缓冲液 I，2μL dNTP（每种均为 10mmol/L），1μL 引物（100ng），1μL Taq 聚合酶，加无核酸酶的水到 100μL。

4. PCR 标记缓冲液：与 PCR 分析溶液相同，体积为 99μL，只是另加入 1μL SpectrumOrange™ dUTP 或 SpectrumGreen™ dUTP。

5. 100ng/μL 引物。

6. 50nmol SpectrumOrange™ dUTP/ SpectrumGreen™ dUTP（Vysis Inc.，Downers Grove，IL）或者其他一些标记三磷酸核苷，用 50μL 无核酸酶的水溶解成为 1mmol/L 溶液，在－20℃条件下可以保存 3 个月。

7. Taq 聚合酶：任何商业的产品均可以用，但是用前需要用特定的底物选择合适的工作液浓度。

8. 无核酸酶的水。

9. 浅白色矿物油（如果需要的话）（Sigma Chemical Co.，St. Louis，MO）。

10. NuSieve GTG 琼脂糖（FMC BioProducts，Rockland，ME）。

11. 1×TBE 电泳缓冲液（BioRad，Hercules，CA）。

12. 引物：使用引物 6MW（30），引物序列为：5′CGA CTC GAG NNN NNN ATG TGG 3′。

2.4 用脂族胺标记探针

1. 待标记的胺修饰 DNA。

2. 适当的反应缓冲液［异硫氰酸和氯磺酸用 50mmol/L pH 9.3 的四硼酸钠，*N*-羟基丁二酯用 pH 7.4 的 0.2mol/L 3-（N 吗啉代）丙磺酸（MOPS；Sigma Chemical Co.）或者用 50mmol/L pH8.5 的四硼酸钠］。

3. 待标记的胺活化衍生物。

4. 二甲基亚砜（DMSO）、二甲基甲酰胺或丙酮（可以溶解预期胺活化标记物的任何一种，浓度为 10～20mmol/L）。

5. 预先装好柱的 Sephadex G-25 型离心柱（Amersham Pharmacia，Piscataway，NJ）。

6. TE 溶液：10mmol/L Tris-HCl pH 7.5～8，1mmol/L EDTA。

2.5 用 Universal Linkage System（ULS）标记

1. TE 缓冲液：10mmol/L Tris-HCl，0.3mmol/L EDTA（pH 8.0）。

2. 待标记的 DNA。

3. DNA 酶 I（Roche Biochemicals，Nutley，New Jersey. 目录号为 104159）：大约 2000U/mg。

4. 5mmol/L 乙酸钠，1mmol/L $CaCl_2$，50%甘油 pH 8.0。

5. 10×缺口缓冲液：50mmol/L Tris-HCl，pH 7.5，10mmol/L $CaCl_2$，10 mmol/L $MgCl_2$。

6. 10mol/L 乙酸胺。

7. 无水乙醇。

8. Kreatech 试剂盒组成：管 1：LK1101（60μL 罗丹明-ULS®，0.5U/μL）或 LK1301（60μL dGreen-ULS®，0.5U/μL）；管 2：LK006，标记溶液 2mL。

9. 离心柱：ProbeQuant™ G-50 型离心柱（Amersham Pharmacia Biotech，Piscataway，NJ）或 QIAquick™离心柱（Qiagen，Valencia，CA）。

10. 超声波破碎仪（如 Branson Ultrasonics，Danbury，CT）。

2.6 可间接检测蛋白质的标记

1. 待标记荧光基团的羟基丁二酯。

2. DMSO、二甲基甲酰胺或丙酮（可以选择溶解胺活化标记物的任何一种，浓度为 20mmol/L）。

3. 预先装好柱的 Sephadex G-25 型离心柱（Amersham Pharmacia）。

4. 50mmol/L 硼酸，pH 8.5～9.3。

5. TBS：25mmol/L Tris-HCl，140mmol/L NaCl，51mmol/L KCl，pH 7.4。

6. PBS：10mmol/L Na_2HPO_4，1.8mmol/L KH_2PO_4，140mmol/L NaCl，2.7mmol/L KCl，pH 7.4。

3. 方法

3.1 缺口平移

缺口平移是一种将标记核苷酸掺入到 DNA 中的方法，这些 DNA 可以是孤立的 DNA 片段或是一个完整克隆[39,40]。该方法利用两种酶的联合作用：DNA 酶 I 在 DNA 链上打开缺口形成 3′端羟基，DNA 聚合酶 I 在 3′端羟基上加上核苷酸。随着 DNA 聚合的进行，DNA 聚合酶的 5′→3′外切核酸酶活性将缺口 5′端的核苷酸水解。反应进行过程中标记的和未标记核苷酸掺入，各种大小的 DNA 片段被合成，但是没有 DNA 的净合成。产生的双链 DNA 片段在杂交前必须变性。

1. 制备 0.1mmol/L dTTP 溶液：将 100μL 0.3mmol/L dTTP 加入到 200μL 无核酸酶的水中。

2. 制备 0.1mmol/L dNTP 混合物：将 0.3mmol/L dATP、0.3mmol/L dCTP 和 0.3mmol/L dGTP 各 100μL 混合。多余的核苷酸混合物可在－20℃或－80℃保存。

3. 对于每个标记反应，在放置在冰上的小离心管中加入 1μg DNA、0.2mmol/L 荧光基团标记的 dUTP 2.5μL、0.1mmol/L dTTP 5μL、0.1mmol/L dNTP 混合物 10μL、10×缺口平移缓冲液 5μL，加无核酸酶的水到 40μL（见注释 1）。

4. 每个小离心管中加入缺口平移酶混合物 10μL。

5. 混匀并稍离心。

6. 在 15℃条件下温育 8～16h。

7. 加入 5μL 反应终止液。

8. 为了去掉未掺入的核苷酸，加入 5μL 3mol/L 乙酸钠、125μL 无水乙醇，用 12 000r/min 的离心速度离心 20～30min。小心地倒掉上清或用微量移液器吸去上清。加入 100μL 70%乙醇，稍振荡，用 15 000*g* 离心 5min。小心地倒掉上清或用微量移液器吸去上清（见注释 2）。

9. 用真空冷冻干燥器处理样品 10～20min。用 10μL TE 重悬沉淀，使终浓度约为 100ng/μL（见注释 3 和 4）。也可以用 Sephadex G-50 型离心柱去掉未掺入的核苷酸，操作步骤按照产品说明书进行。用离心柱处理后，标记 DNA 体积范围为 50～100μL，然后按照步骤 8 进行浓缩。

10. 为了确定标记 DNA 片段的大小，在 50mL TAE 或 TBE 缓冲液中加入 0.5g 琼脂糖，用微波炉或电热板小心加热至沸腾。当琼脂糖全部溶解，在水浴中降温至 55℃。

11. 在琼脂糖中加入 2.5μL EB 混匀后，将琼脂糖倒在具有 12 孔或 16 孔梳子的铺胶板上。

12. 对于每个标记 DNA 样品，将 2μL DNA（约 200ng）、7μL 水（TAE 或 TBE）和 1μL 上样缓冲液混合。

13. 将每个标记样品和分子质量参考在 70～100V 下电泳，直至前面的染液在凝胶中迁移约 5cm。

14. 在紫外投射反射仪上观察 DNA，并拍照。大部分的 DNA 片段应在200～600bp。

3.2 随机引物标记

随机引物标记是通过所有可能的六聚体、八聚体或九聚体核苷酸与变性的 DNA 复性进行标记的一种方法[41,42]。这些小的寡聚核苷酸作为引物，通过 Klenow 酶催化掺入标记和未标记的核苷酸，使互补 DNA 链合成。标记物是双链和单链 DNA 片段的混合物，因此在杂交前需变性。

1. 制备 10×dNTP 混合物：终浓度为 1mmol/L dATP、1mmol/L dCTP、1mmol/L dGTP、0.3mmol/L 荧光基团标记的 dUTP 和 0.7mmol/L dTTP。多余的核苷酸混合物可在－20℃或－80℃保存。

2. 用 20μL 无核酸酶的水溶解 DNA（最好为 400～500ng，见注释 5 和 6）。

3. 加入 20μL 2.5×随机引物缓冲溶液。

4. 在沸腾的水中变性 5min，然后快速放在冰上。

5. 在冰上加入 5μL 10× dNTP 混合物、4μL 无核酸酶的水，使最终的溶液体积为 49μL。

6. 混匀并稍离心。

7. 加入 1μL Klenow 酶混匀，稍离心。

8. 在 37℃条件下温育 1～6h，较长的温育时间通常会提高产物量（见注释 7）。

9. 加入 5μL 反应终止液。

10. 加入 5μL 3mol/L 乙酸钠、125μL 无水乙醇，用 15 000*g* 离心 20～

30min，去除未掺入的核苷酸和引物。小心地倒掉上清或用微量移液器吸去上清。加入 100μL 70%乙醇，稍振荡，用 15 000*g* 离心 5min。小心地倒掉上清或用微量移液器吸去上清。

11. 用真空冷冻干燥器处理样品 10～20min。用 20μL TE 重悬沉淀，使终浓度约为 100ng/μL。也可以用 Sephadex G-50 型离心柱去掉未掺入的核苷酸，操作步骤按照产品说明书进行。用离心柱处理后，标记 DNA 体积为 50～100μL，按照步骤 10 进行乙醇沉淀浓缩。

12. 最适的片段大小在 200～600bp，可通过电泳进行判定。电泳的操作步骤参照本章 3.1 中的步骤 10～14。

3.3 DOP-PCR

显微切割或流式分选的染色体经过 PCR 扩增制备整条染色体的 DNA，被认为是对某条染色体全部涂染的高质量探针的首选途径。对于单个染色体、多色 FISH（M-FISH）[43]或光谱核型分析[44]中所有 24 条染色体的涂染均是此种情况。下面提供的操作程序[45]是简并寡核苷酸引物 PCR（DOP-PCR）最原始操作程序[38]的修改版本，适于用 SpectrumOrange™ dUTP 或 SpectrumGreen™ dUTP（Vysis Inc.）扩增染色体 DNA。此操作程序稍做修改或不做修改，就可以用各种其他的标记 dUTP 扩增染色体 DNA。反应涉及的寡核苷酸，其 5′端有 *Xho*I 限制性内切核酸酶酶切位点，3′端有确定的寡聚六核苷酸序列和中间有一系列简并核苷酸序列（所有四核苷酸的随机混合）。从理论上计算表明在整个基因组中每 4kb 就有一个这种确定的六核苷酸序列。在合适条件下，用此序列作为引物的扩增可绕过特定的 3′序列，也许通过一个或更多的简并核苷酸进行退火提高稳定性[38]，5′端特定序列使得该引物在较高的温度退火。在实际应用中，DOP-PCR 操作程序开始的几个循环中用低退火温度（低保真 PCR），然后进行多个循环的高退火温度（高保真 PCR），产生随机扩增的 DNA 混合物。

流式分选的染色体一般通过两轮 DOP-PCR 的扩增，其产物在荧光标记的三磷酸核苷酸存在的条件下进行第三轮扩增而得到标记。虽然缺口平移方法也可以用于标记进行染色体分析的探针，但获得高质量探针一般不需该步骤。

3.3.1 DNA 的扩增

一般来说，流式分选的染色体进行重悬并在 PCR 分析缓冲液中扩增，PCR 条件为：95℃、5min，然后 9 个循环的 94℃、1min，30℃、1.5min，72℃、3min，升降温时间为 2min、5s；接下来进行 35 个循环的 94℃、15s，62℃、15s，72℃、15s（见注释 8～10）；然后进行单独 72℃延伸 10min，最后保存在 4℃。1μL 上述 PCR 产物在 100μL 体系中按照同一 PCR 条件进行再扩增。10μL

扩增产物在1%的琼脂糖凝胶上电泳，形成大小为300～1000bp的成片条带。DNA的最终产量在1.5～3.0μg（见注释11）。

3.3.2 DNA标记

1μL上述PCR产物在PCR标记缓冲液中，用扩增DNA的PCR条件进行标记。1～2μL的标记DNA不用纯化就可直接用于杂交。

3.4 用脂族胺标记DNA探针

除了用聚合酶掺入标记核苷酸的一步探针标记法，也可以用两步标记程序，包括：①应用上述聚合酶标记探针程序（见本章3.1～3.3）将脂族胺取代基掺入探针DNA；②将修饰的DNA与胺活化荧光基团进行连接。两步标记程序使得任何胺活化荧光基团可以与修饰的DNA进行结合，而不是只用与三磷酸核苷结合的荧光基团商业化产品。另外，所有聚合酶标记程序可以用同样的三磷酸核苷 烯丙胺 dUTP，因此单一的聚合酶反应条件就可以用于所有荧光标记，无需对不同三磷酸核苷荧光基团进行反应条件最优化试验。同时，烯丙胺-dUTP的掺入比其他核苷酸的掺入更有效。用两步标记程序对烯丙胺-dUTP进行标记的试剂盒现已有售（ARES标记试剂盒，Molecular Probes，Inc.，Eugene，OR）。

应用烯丙胺-dUTP代替标记三磷酸核苷，脂族胺通过酶促反应掺入DNA，从而可以按照下述步骤与胺活化荧光基团、生物素或半抗原结合。该步骤同样可以用于通过其他一些化学方法掺入的脂族胺探针的标记[22,46]。这包括含有通过亚磷酰胺化学（核酸化学合成）掺入的脂族胺修饰的碱基，或3′或5′胺修饰末端合成的DNA、RNA和PNA寡聚体。

1. 用适当的反应缓冲液溶解胺修饰DNA，最终浓度为0.6～1.0mL反应缓冲液中有10nmol脂族胺。

2. 在适当的溶剂中溶解胺活化标记化合物，终浓度为10～20mmol/L。

3. 在胺修饰的DNA中加入多于50倍（异硫氰酸）或100～200倍（羟基丁二酯或氯磺酸）摩尔的胺活化染色剂（见注释12）。

4. 将反应溶液在室温条件下搅拌过夜。

5. 利用水或TE平衡和洗脱的Sephadex G-25型离心柱，用凝胶渗透层析方法将探针和末结合的标记物进行分离。标记的探针洗脱在已占体积内（见注释13）。

6. 将标记的探针在4℃或更低的温度条件下保存备用。

3.5 ULS标记

Universal Linkage System（ULS®；KREATECH Biotechnology BV，阿姆斯特丹，荷兰）是用铂染色络合物与鸟嘌呤核苷的N7残基反应进行标记的方法。反应使核酸与铂荧光基团之间形成稳定的化学键。依据反应条件，ULS化合物在较低的程度上也与腺嘌呤形成络合物。该方法已用于DNA（包括质粒，黏粒，分子质量参考物，在低熔点琼脂糖中的DNA、BAC、PAC、YAC，全染色体文库，DOP-PCR产物，如卫星、着丝粒和端粒DNA的高度重复序列）、RNA、PNA、寡聚核苷酸和扩增的核酸产物[16,47]。在Molecular Probes公司（Eugene，OR）同样提供ULS试剂和试剂盒。

用任何ULS化合物进行标记的模板大小必须小于1000bp。大于1000bp的模板通常会产生大量的点状背景。PCR产物一般小于1000bp，因此可直接进行标记。下面将要阐述的两种DNA破碎方法——超声破碎和酶切均可以用于Kreatech和Molecular Probes的操作步骤。Molecular Probes用Alexa-ULS试剂时推荐用另一DNA酶I操作程序。操作步骤和相应的试剂是Molecular Probes提供的ULS标记试剂盒的一部分。

3.5.1 DNA破碎

3.5.1.1 超声破碎

1. 用TE制备DNA溶液（20ng/μL），最好用至少100μL DNA溶液进行超声破碎。

2. 将样品放在冰上，用一个小的锥形底塑料管进行3个循环、每次循环1min的超声破碎DNA。选择超声破碎仪的功率水平和工作循环数，尽量使用最高的功率、尽量少的空泡形成。在破碎前和每个循环之后均将DNA溶液放在冰上1min预冷。在第二个和第三个循环前用微型离心机的最高转速离心DNA溶液5s，使全部溶液落至管底（见注释14）。

3. 取部分DNA溶液在1%的琼脂糖凝胶上电泳确定DNA大小是否合适。电泳操作步骤参考本章3.1的步骤10～14。

4. 开始进行标记程序。

3.5.1.2 DNA酶处理

1. 制备DNA酶I的储存液：用1mL 5mmol/L乙酸钠、1mmol/L $CaCl_2$、50%甘油pH 5.2溶解1mg DNA酶I（大约2000U/mg，Roche公司，目录号104109）。在加冻干的DNA酶之前和期间，缓冲液均放置在冰上。上下翻转溶液直至完全混匀，不能振荡，储存液保存在-20℃条件下并尽量避免反复冻融。

2. 用1×缺口平移缓冲液稀释DNA酶储存液，稀释比例为1∶500（见注释

15)。

3. 在冰上将下列成分加到小离心管中：1μL 模板 DNA、2.5μL 10×缺口平移缓冲液、3～5μL 稀释的 DNA 酶 I，加水至 25μL。

4. 将上述小离心管置 37℃温育、10min。

5. 将小离心管放在冰上终止反应。

6. 在上述反应物中加入 1/4 体积的 10mmol/L 乙酸铵和 2.5 倍体积的无水乙醇进行沉淀。

7. 用适当体积的标记溶液重悬沉淀（见本章 3.5.2）。

8. 取部分 DNA 溶液在 1%的琼脂糖凝胶上电泳确定 DNA 大小是否合适。

3.5.2 标记

3.5.2.1 KREATECH 推荐的操作程序

当 ULS 试剂与核酸以 1∶1 比例（如 1U ULS 试剂∶1μg DNA）混合，可获得合适的标记效率。当标记的核酸量不是标准的 1μg 时，核酸与 ULS 试剂的比例必须保证 1∶1。当标记的核酸量少时，应该至少 100ng、20μL 体积。另外，标记较大的核酸量，不应超过 20μL 中 10μg 核酸。只有模板浓度不低于 5ng/μL 可以用较大体积进行标记，ULS 试剂量随着加入的模板量进行调整。如果模板稀释度太大，可以不加标记溶液。

1. 在 1μg 模板中加入 1U（2μL）ULS 试剂（见注释 16 和 17）。

2. 用标记溶液将体积调至 20μL，混匀。

3. 在 65℃条件下温育 15min。

4. 稍离心。

5. 用离心柱纯化探针。

3.5.2.2 Molecular Probes 公司推荐的操作程序

Molecular Probes 公司提供应用 ULS 标记系统结合各种染料的试剂盒。该试剂盒包括破碎 DNA 和标记探针所用的各种试剂。除了以下几项外，标记操作程序和注意事项基本相同。

1. 在标记前，Molecular Probes 的 ULS 染料试剂依据选择的染料溶于不同的缓冲液中。有一个图表提供了与各个染料相关的所有特定信息。

2. 标记前，DNA 在 95℃变性 5min，然后在冰上快速冷却。请注意：变性不是必需的步骤，但可以提高标记效率 20%～40%。

3. 标记反应物体积是 25μL。

4. 在 80℃温育 15min。

5. Molecular Probes 声明：由于该公司 ULS 试剂结合的自有染料的特异性，对以前 Kreatech 提供的操作步骤已经做了修改。

3.6 间接检测的标记蛋白

通过将荧光基团与蛋白质（如抗生物素蛋白、链霉亲和素或抗体蛋白）结合制备间接标记 FISH 探针的辅助检测试剂。许多种类的由荧光基团标记的抗生物素和抗体已商品化（如 Accurate Chemical and Scientific Co.，Westbury，NY；Calbiochem，San Diego，CA；Cappel Organon Teknika，Durham，NC；DAKO Corp.，Carpinteria，CA；Jackson ImmunoResearch Laboratories，West Grove，PA；Kirkegaard and Perry Laboratories，West Grove，PA；Molecular Probes，Inc.，Eugene，OR；Pierce Chemical Co.，Rockford，IL；Sigma Chemical Co.，St. Louis，MO）标记的蛋白质在实验室制备也相当容易。未标记的抗生物素和其他抗体均可从上述所列公司获得。

作为辅助检测试剂，选择链霉亲和素多于抗生物素，因为其等电点接近中性 pH，一般认为可以降低非特异性结合。同样，当整个抗体用于 FISH 时，常常去掉较为疏水的 Fc 区以降低非特异结合。Fc 区可以通过木瓜蛋白酶消化从抗体中的抗原结合簇切除，产生 Fab 颗粒（单个结合臂），也可以通过胰蛋白酶产生仍相连接的两个结合臂 $F(ab')_2$。Fab′颗粒可以从 $F(ab')_2$ 中制备，只是选择性减少连接两个结合臂的二硫键。制备 $F(ab')_2$、Fab 和 Fab′抗体片段的方法可以从文献中找到[48,49]。

1. 用 pH 8.5～9.3 的 50mmol/L 硼酸稀释蛋白质至终浓度为 1～10mg/mL。

2. 用 DMSO、二甲基甲酰胺或丙酮溶解要求的荧光基团的 *N*-羟琥珀酸酯衍生物，终浓度为 20mmol/L。

3. 在蛋白质溶液中加入足够体积的荧光基团溶液，使荧光基团比蛋白质摩尔数多 1～20 倍（见注释 18 和 19）。

4. 将反应物在室温条件下轻柔摇动 2h 进行反应。

5. 利用 TBS 或 PBS 平衡和洗脱的 Sephadex G-25 型离心柱，用凝胶渗透层析方法将蛋白质和未结合的荧光基团进行分离。标记的蛋白质洗脱在已占体积内（见注释 20）。

6. 将标记蛋白质保存于 4℃备用（见注释 21）。

3.7 标记探针的特征性指数

为了准确计算探针浓度，应有足够的 DNA、溶液体积应大于荧光光度计比色杯中所需溶液的最小量而获得的吸光度值至少约 0.05。常规测定吸光度值的分光光度计比色杯通径长度为 1cm，需要溶液的最小体积是几百微升（半微量比色杯）。有关 DNA 测定的专用分光光度计可以用约 10μL 体积的比色杯。下面的

公式可以用 260nm 波长测定的吸光度值（A_{260}）来计算核酸浓度［nucl］：

$$[\text{nucl}] = [A_{260} - (\varepsilon_{F,260}/\varepsilon_{F,MAX})A_{F,MAX}]/\varepsilon_{nucl,260}$$

式中，$\varepsilon_{nucl,260}$表示核酸在 260nm 波长下的吸光度消光系数；$\varepsilon_{F,260}/\varepsilon_{F,MAX}$表示标记物在 260nm 的吸光度消光系数 $\varepsilon_{F,260}$与最长波长吸光带的峰值波长的吸光度消光系数 $\varepsilon_{F,MAX}$的比值。标记探针的该比例与未结合标记物在两个波长下的吸光度值比例大概相同。对于单链 DNA，$\varepsilon_{nucl,260} = 10\,000M^{-1} \cdot cm^{-1}$或 0.0286（μg/mL）mL·$M^{-1} \cdot cm^{-1}$。前面的值是核酸摩尔浓度，后者是每毫升核酸的毫克浓度。从探针在标记物中的长波长吸光度最大值计算标记浓度［F］：

$$[F] = A_{F,MAX}/\varepsilon_{F,MAX}$$

在公式中将核酸吸光度值忽略。$\varepsilon_{F,MAX}$值可以从标记试剂提供商得到，核酸标记百分比等于 100［F］/［nucl］。

当探针量太少而不能获得准确的吸光度测量值，或包含一些污染的 RNA 时，用双苯并咪唑（bisbenzimide)(众所周知的 Hoescht 33258 染料）的荧光测定可以用来确定核酸浓度。Hoescht 染料与 RNA 没有亲和力，但可与双链 DNA 的小沟结合。与 DNA 结合的 Hoescht 33258 染料可以在 365nm 激发，在 458nm 达到最大发射。荧光测定方法非常敏感，可以用于浓度范围在 0.01～5mg/mL 的 DNA，最适 DNA 浓度范围为 0.05～0.3mg/mL。

DNA 溶液样品 F_S 以及同一溶液减去 DNA（空白对照）F_B 测定相对荧光强度。另外，还测量 DNA 标准溶液的荧光强度 F_{STD}和相应空白溶液的荧光强度 $F_{STD,B}$（通常样品和标准空白溶液是相同的）。DNA 标准溶液应有一定的 DNA 浓度［DNA］$_{STD}$应与 DNA 样品溶液的预期浓度相近。样品 DNA 浓度［DNA］$_S$按照下式进行计算：

$$[\text{DNA}]_S = [\text{DNA}]_{STD}(F_S - F_B)/(F_{STD} - F_{STD,B})$$

欲获得可重复性好的结果，移液准确操作和溶液的彻底混匀是非常关键的。

可以通过吸光度分光光度计用核酸探针同样的公式确定蛋白质浓度和标记百分比，只是蛋白质用 280nm、而不是 260nm 波长的测量值。报道中山羊 IgG 和 Fab′的吸光度消光系数分别为 198 000$M^{-1} \cdot cm^{-1}$、61200$M^{-1} \cdot cm^{-1}$，$F(ab')_2$的消光系数应是 Fab′的 2 倍。

4. 注释

1. 荧光基团如果长时间暴露于光线下就发生光漂白。荧光基团标记的 DNA 或标记的 dUTP 可较短时间暴露于光线下，但避免超过实验准备的时间。

2. 如果在电泳前去除未掺入的核苷酸，更容易确定 DNA 片段的大小范围。

3. 在乙醇沉淀后，一般用肉眼可见的红色或橙色荧光标记的 DNA 沉淀，而那些用绿色荧光标记的 DNA 沉淀显示白色或浅绿色。

4. 每 10μL FISH 探针混合物中含 50～100ng 红色或橙色标记的单一序列探针，200～400ng 绿色荧光标记的探针可以在多数种类的样品中产生足够亮的信号。

5. 为了获得较好的结果，模板 DNA 应为线性的，最好用六碱基识别位点的限制性内切核酸酶消化，酚/氯仿抽提后用乙醇沉淀。

6. 最初的 DNA 含量范围为 10ng～3μg。

7. 在 37℃条件下标记时间范围从 1h 到过夜。每一种标记应预先确定最适条件。

8. 在 PCR 操作中污染是非常严重的问题。为了避免 PCR 反应的污染，尽量用最好质量的试剂，这些试剂仅用于 PCR。所有溶液最好分装，并冻存于 −20℃备用。同时，用防气溶胶的管尖移液以减少交叉感染。指定实验室中一个区域专门用于 PCR 操作。如果可能，DNA 样品的制备在单独实验室进行。另外，每次 PCR 实验操作选择合适的阴性对照（无靶序列）是非常重要的。

9. 特定靶序列的 PCR 需要对 Taq 酶进行滴度测定。过多的酶可导致非特异性背景。

10. 改变循环数目以确定获得最好信噪比的合适循环数。

11. 大分子质量 DNA（电泳时可见从胶孔到约 2.0kb 大小的成片条带）的存在表明标记的探针不合适。这种探针可导致非特异性、非细胞成分的高背景，有时可以通过超声破碎降低背景。如注释 9 中提到的 Taq 酶滴定方式，确定合适的 PCR 循环数。

12. 除非已知 DNA 可溶于较高比例的溶液中，有机溶剂与含水缓冲液的比例不应超过 1∶4。

13. 作为胶渗透层析的替代方法，未结合的荧光基团可以通过在储存缓冲液（如 TE）中透析从蛋白质中分离出来。每隔几个小时更换缓冲液直至未结合的荧光基团完全去除（两次或更多次换液）。

14. 超声破碎时，样品体积、装样品的容器种类、超声破碎的时间和循环数、超声破碎仪功率水平和工作循环均依据超声破碎仪生产厂家、型号和探针而不同。为获得大小合适的核酸片段有时需要进行一些预实验。

15. 进行 DNA 酶 I 消化时，所有的试剂均应放在冰上。用前临时配制溶液。

16. DNA 在标记前应进行纯化，去除蛋白质、RNA 和游离核苷酸。

17. 应尽量避免高浓度 Tris（＞40mmol/L）或 EDTA（＞5mmol/L）、乙酸镁（＞100mmol/L）、NaCl（＞100mmol/L）和限制性内切核酸酶消化缓冲液，因为这些对标记反应有限速效应。

18. 活化荧光基团与蛋白质的超额摩尔数和蛋白质浓度决定蛋白质标记的程度。用标记蛋白质试剂进行最佳标记所需的标记率决定于所用的荧光基团和蛋白质的种类，并通过预实验确定。标记率太低导致荧光信号弱，标记率太高抑制特

异性蛋白质结合反应，增加非特异性结合。

19. 蛋白质中加入的 20mmol/L 荧光基团不应将有机溶剂浓度超过反应体系体积的 20%，以防止蛋白质变性。

20. 作为凝胶渗透层析的替代方法，在 TBS 或 PBS 中通过透析将未结合的荧光基团从蛋白质中分离出来。每隔几个小时更换缓冲液直至缓冲液不再显示染料颜色。

21. 在文献中有大量其他标记蛋白质的操作程序，也可从标记试剂提供商得到［例如，见 Molecular Probes 公司的“胺活化探针”信息资料或 Research Organics（Cleveland，OH）公司提供的“用荧光基团标记蛋白质操作程序”］。

（刘青杰 译，陈德清 校）

参考文献

1. Bueno, D., Skinner, J., Abud, H., and Heath, J. K. (1996) Double in situ hybridization on mouse embryos for detection of overlapping regions of gene expression. *Trends Genet.* **12,** 385–387.
2. Diwu, Z., Klaubert, D. H., and Haugland, R. P. (1999) Spectral properties and biological applications of ELF enzyme substrates that generate bright fluorescent precipitates at the enzymatic activity sites. *Proc. SPIE-Intl. Soc. Opt. Eng.* **3602,** 265.
3. Jowett, T. and Yan, Y. L. (1996) Double fluorescent in situ hybridization to zebrafish embryos. *Trends Genet.* **12,** 387–389.
4. Bobrow, M. N., Harris, T. D., Shaughnessy, K. J., and Litt, G. J. (1989) Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *J. Immunol. Methods* **125,** 279–285.
5. Raap, A. K., Van De Corput, M. P., Vervenne, R. A., Van Gijlswijk, R. P., Tanke, H. J., and Wiegant, J. (1995) Ultra-sensitive FISH using peroxidase-mediated deposition of biotin- or fluorochrome tyramides. *Hum. Mol. Genet.* **4,** 529–534.
6. Speel, E. J., Ramaekers, F. C., and Hopman, A. H. (1997) Sensitive multicolor fluorescence *in situ* hybridization using catalyzed reporter deposition (CARD) amplification. *J. Histochem. Cytochem.* **45,** 1439–1446.
7. Bauman, J. G., and Van Duijn, P. (1981) Hybrido-cytochemical localization of specific DNA sequences by fluorescence microscopy. *Histochem.* J. **13,** 723–733.
8. Cremer, T., Landegent, J., Bruckner, A., et al. (1986) Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and nonradioactive *in situ* hybridization techniques: Diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84. *Hum. Genet.* **74,** 346–352.
9. Cremer, T., Tesin, D., Hopman, A. H., and Manuelidis, L. (1988) Rapid interphase and metaphase assessment of specific chromosomal changes in neuroectodermal tumor cells by *in situ* hybridization with chemically modified DNA probes. *Exp. Cell Res.* **176,** 199–220.
10. Landegent, J. E., Jasen in De Wal, N., Baan, R. A., Hoeijmakers, J. H., and Van Der Ploeg, M. (1984) 2-Acetylaminofluorene-modified probes for the indirect hybridocytochemical detection of specific nucleic acid sequences. *Exp. Cell Res.* **153,** 61–72.
11. Nederlof, P. M., Robinson, D., Abuknesha, R., et al. (1989) Three-color fluorescence *in situ* hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences. *Cytometry* **10,** 20–27.

12. Nederlof, P. M., Van Der Flier, S., Wiegant, J., et al. (1990) Multiple fluorescence *in situ* hybridization. *Cytometry* **11,** 126–131.
13. Dale, R. M. and Ward, D. C. (1975) Mercurated polynucleotides: New probes for hybridization and selective polymer fractionation. *Biochemistry* **14,** 2458–2469.
14. Hopman, A. H., Wiegant, J., Tesser, G. I., and Van Duijn, P. (1986) A nonradioactive *in situ* hybridization method based on mercurated nucleic acid probes and sulfhydryl-hapten ligands. *Nucl. Acids Res.* **14,** 6471–6488.
15. Hopman, A. H., Wiegant, J., and Van Duijn, P. (1987) Mercurated nucleic acid probes, a new principle for nonradioactive *in situ* hybridization. *Exp. Cell Res.* **169,** 357–368.
16. Van Belkum, A., Linkels, E., Jelsma, T., Van Den Berg, F. M., and Quint, W. (1994) Nonisotopic labeling of DNA by newly developed hapten-containing platinum compounds. *Biotechniques* **16,** 148–153.
17. Draper, D. E. (1984) Attachment of reporter groups to specific, selected cytidine residues in RNA using a bisulfite-catalyzed transamination reaction. *Nucl. Acids Res.* **12,** 989–1002.
18. Reisfeld, A., Rothenberg, J. M., Bayer, E. A., and Wilchek, M. (1987) Nonradioactive hybridization probes prepared by the reaction of biotin hydrazide with DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **142,** 519–526.
19. Keller, G. H., Huang, D. P., and Manak, M. M. (1989) Labeling of DNA probes with a photoactivatable hapten. *Anal. Biochem.* **177,** 392–395.
20. Keller, G. H., Cumming, C. U., Huang, D. P., Manak, M. M., and Ting, R. (1988) A chemical method for introducing haptens onto DNA probes. *Anal. Biochem.* 170, 441–450.
21. Chu, B. C., Wahl, G. M., and Orgel, L. E. (1983) Derivatization of unprotected polynucleotides. *Nucl. Acids Res.* **11,** 6513–6529.
22. Morrison, L. E., Halder, T. C., and Stols, L. M. (1989) Solution-phase detection of polynucleotides using interacting fluorescent labels and competitive hybridization. *Anal. Biochem.* **183,** 231–244.
23. Langer, P. R., Waldrop, A. A., and Ward, D. C. (1981) Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78,** 6633–6637.
24. Langer-Safer, P. R., Levine, M., and Ward, D. C. (1982) Immunological method for mapping genes on Drosophila polytene chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79,** 4381–4385.
25. Manuelidis, L., Langer-Safer, P. R., and Ward, D. C. (1982) High-resolution mapping of satellite DNA using biotin-labeled DNA probes. *J. Cell. Biol.* **95,** 619–625.
26. Ried, T., Landes, G., Dackowski, W., Klinger, K., and Ward, D. C. (1992) Multicolor fluorescence *in situ* hybridization for the simultaneous detection of probe sets for chromosomes 13, 18, 21, X and Y in uncultured amniotic fluid cells. *Hum. Mol. Genet.* **1,** 307–313.
27. Arnoldus, E. P., Wiegant, J., Noordermeer, I. A., et al. (1990) Detection of the Philadelphia chromosome in interphase nuclei. *Cytogenet. Cell. Genet.* **54,** 108–111.
28. Wiegant, J., Ried, T., Nederlof, P. M., Van Der Ploeg, M., Tanke, H. J., and Raap, A. K. (1991) *In situ* hybridization with fluoresceinated DNA. *Nucl. Acids Res.* **19,** 3237–3241.
29. Ried, T., Baldini, A., Rand, T. C., and Ward, D. C. (1992) Simultaneous visualization of seven different DNA probes by *in situ* hybridization using combinatorial fluorescence and digital imaging microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89,** 1388–1392.
30. Telenius, H., Pelmear, A. H., Tunnacliffe, A., et al. (1992) Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. *Genes Chromosomes Cancer* **4,** 257–263.

31. Morrison, L. E. and Legator, M. S. (1999) Multi-color fluorescence in situ hybridizations techniques, in *An Introduction to Fluorescence* in situ *Hybridization: Principles and Clinical Applications* (Andreeff, M. and Pinkel, D., eds.), Wiley-Liss, New York, pp. 77–118.
32. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
33. Collins, C., Kuo, W. L., Segraves, R., Fuscoe, J., Pinkel, D., and Gray, J. W. (1991) Construction and characterization of plasmid libraries enriched in sequences from single human chromosomes. *Genomics* **11,** 997–1006.
34. Deaven, L. L., Van Dilla, M. A., Bartholdi, M. F., et al. (1986) Construction of human chromosome-specific DNA libraries from flow-sorted chromosomes. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51,** 159–167.
35. Carter, N. P., Ferguson-Smith, M. A., Perryman, M. T., et al. (1992) Reverse chromosome painting: A method for the rapid analysis of aberrant chromosomes in clinical cytogenetics. *J. Med. Genet.* **29,** 299–307.
36. Telenius, H., De Vos, D., Blennow, E., Willat, L. R., Ponder, B. A., and Carter, N. P. (1993) Chromatid contamination can impair the purity of flow sorted metaphase chromosomes. *Cytometry* **14,** 97–101.
37. Guan, X. Y., Meltzer, P. S., and Trent, J. M. (1994) Rapid generation of whole chromosome painting probes (WCPs) by chromosome microdissection. *Genomics* **22,** 101–107.
38. Telenius, H., Carter, N. P., Bebb, C. E., Nordenskjold, M., Ponder, B. A., and Tunnacliffe, A. (1992) Degenerate oligonucleotide-primed PCR: General amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* **13,** 718–725.
39. Cherif, D., Bernard, O., and Berger, R. (1989) Detection of single-copy genes by nonisotopic *in situ* hybridization on human chromosomes. *Hum. Genet.* **81,** 358–362.
40. Kelly, R. B., Cozzarelli, N. R., Deutscher, M. P., Lehman, I. R., and Kornberg, A. (1970) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleic acid. XXXII. Replication of duplex deoxyribonucleic acid by polymerase at a single strand break. *J. Biol. Chem.* **245,** 39–45.
41. Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132,** 6–13.
42. Feinberg, A. P. and Vogelstein, B. (1984) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Addendum. *Anal. Biochem.* **137,** 266–267.
43. Speicher, M. R., Gwyn Ballard, S., and Ward, D. C. (1996) Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat. Genet.* **12,** 368–375.
44. Schrock, E., Du Manoir, S., Veldman, T., et al. (1996) Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* **273,** 494–497.
45. Morrison, L., Legator, M., Ramakrishnan, R., Zimmerman, D., Volling-Kwasneski, M., and Koeppen, P. (1998) FISH karyotyping with combinations of whole chromosome probes directly labeled with five visible fluorescent labels. *Cytometry* **Supplement 9,** 150.
46. Morrison, L. E. (1995) Detection of energy transfer and fluorescence quenching, in *Nonisotopic probing, blotting, and sequencing* (Kricka, L. J., ed.), Academic Press, San Diego, pp. 429–471.
47. Van Belkum, A., Linkels, E., Jelsma, T., Houthoff, H. J., Van Den Berg, F., and Quint, W. (1993) Application of a new, universal DNA labeling system in the PCR mediated diagnoses of Chlamydia trachomatis and human papillomavirus type 16 infection in cervical smears. *J. Virol. Methods* **45,** 189–200.
48. Garvey, J. S., Cremer, N. E., and Sussdorf, D. H. (1977) *Methods in Immunology: A Laboratory Text for Instruction and Research*. 3rd ed. W. A. Benjamin, Inc., Reading, PA.
49. Morrison, L. E. (1988) Time-resolved detection of energy transfer: Theory and application to immunoassays. *Anal. Biochem.* **174,** 101–120.

第3章　以RNA为靶目标FISH探针的标记

Ramesh Ramakrishnan，Larry E. Morrison

1. 引言

标记的RNA、DNA或者核酸类似物可以通过荧光原位杂交（FISH）的方法检测细胞标本内的RNA。目标RNA通常是由基因组DNA转录来的信使RNA（mRNA）。由于高特异的核酸碱基互补配对原则，特定的RNA分子可以从众多共表达的mRNA分子中筛选出来。对选择的mRNA分子进行分析是一项测定多种细胞性质的重要方法，包括鉴定细胞类型、鉴定细胞分化的不同阶段、测量通常伴随肿瘤发展的异常mRNA表达水平等。RNA探针可以直接进行荧光标记或者用偶联荧光化合物的标记物进行标记。一旦进行杂交，目标RNA的存在及其相对丰度可以通过目测荧光强度进行定性检测，也可以通过数码照相及图像分析进行定量检测。

在第2章中关于基因组FISH探针的大多论述也同样适用于靶序列为RNA的FISH探针，包括直接和间接标记、扩增检测反应和荧光标记选择等。DNA探针经常用于RNA的检测，因此第2章叙述的DNA探针标记方法也可以用于制作检测mRNA的DNA探针。

除了第2章叙述的方法外，还有一些特异的方法用于RNA探针的酶标反应。逆转录酶可以以RNA为模板将标记的三磷酸腺苷掺入DNA链中[1~4]，RNA聚合酶则可以将标记的三磷酸腺苷掺入RNA链中[5~8]。

合成的寡聚核苷酸更易于RNA的检测，这是因为和二倍体基因组DNA相比，生物体会合成许多拷贝的某一mRNA分子。合成的寡聚核苷酸包括DNA、RNA以及核酸类似物如肽核酸（PNA），这些分子的合成相对便宜并且可以在末端结合一些不同的荧光基团，也可以在寡聚体合成的过程中将荧光基团整合在寡聚体的内部位点。

下面提供了一些通过FISH技术检测目标RNA的探针标记的常用方法。因为获得合成寡聚核苷酸非常容易，所以这里的方法基本全是基于逆转录酶、DNA聚合酶Ⅰ及RNA聚合酶的酶反应。

1.1 逆转录 PCR（RT-PCR）

下面第一个方法介绍了如何利用 RT-PCR 技术合成与 RNA 转录物对应的荧光素或半抗原标记 DNA 探针[9,10]。和第 2 章叙述的一样，该技术第一步是一个逆转录反应，利用随机六聚体引物或简并寡核苷酸引物（DOP）生成单链的 cDNA。然后利用大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 合成双链 cDNA，接着用同一简并 DOP 引物或转录特异的 PCR 引物及 Taq 聚合酶进行扩增反应。

1.2 单链探针

在用 FISH 技术检测 mRNA 转录物时，一个重要的步骤是生成单链特异探针（反义序列）。在应用 FISH 技术检测细胞中的转录物时可以使用双链探针，而有两个原因使得人们更愿意选择使用单链探针，第一个原因是尽管双链探针可以在杂交之前进行变性，但其复性的速度要比该探针与固定于表面的目标序列杂交快得多，这将导致大量的探针在与目标序列接触前就已经从杂交混合物中排除出来；第二个原因是在 FISH 分析中可利用正义链探针作为一个极好的阴性对照，因此它的互补序列不应该存在于被研究的 mRNA 群体中。

制作 FISH 使用的单链探针有许多方法。在以下 1.2.1 节中介绍了一种制作单链 DNA 探针的方法，和一个可以用来制作反义 RNA 探针或正义 RNA 探针的方法。这两种方法都假定目标序列是一个可用的克隆或一个 cDNA 文库的一部分。

1.2.1 单链 DNA 探针——不对称 PCR

第一个方法通过改变 PCR 条件使其中的一条链优先被合成。该技术被称为不对称 PCR[11,12]。该技术使用的其中一个引物（与要得到的单链互补）浓度要远远大于另一个引物即“限制”引物的浓度。两个引物浓度的比例一般为 50∶1～100∶1。在最初的几个循环（一般 10～15 个循环）双链 DNA 以指数形式生成，当限制引物耗尽后，其中一条链则以线性增长方式大量产生。从而，大约需要 40 个循环的 PCR 反应就能合成足够量的单链探针。通过调节引物的比例，则可通过不同的反应合成各个链的单链探针。下面将介绍制作人类 HLA-G mRNA 序列的单链 DNA 探针的方法。

1.2.2 单链 RNA 探针

第二个方法是将特异病毒 RNA 聚合酶启动子序列连接在目标序列的 5′端，RNA 聚合酶具有高度的序列特异性。当杂交的 DNA 分子在体外具有荧光三磷

酸腺苷存在的情况下被转录时，可以产生具有高特异活性的单链 cRNA 分子。因此可以将不同的 RNA 聚合酶启动子序列（如 T7 或 SP6）分别连接在 DNA 分子的两端，这样在相应的 RNA 聚合酶存在的情况下分别进行体外转录反应，则可生成每条链（正义链或反义链）特异的单链转录物。在荧光标记的核苷酸存在的情况下进行体外转录反应会得到目标序列 50～100 倍的线性扩增。下面会介绍制作人类 HLA-G mRNA 序列的单链正义和反义 RNA 探针的方法。

1.3 原位逆转录 PCR（in situ RT-PCR）

当所用核酸水平低时，原位杂交会因灵敏度而受到限制。这种情况下，可以分别用原位 PCR[13～15] 和原位 RT-PCR[16,17] 来定位组织标本中的 DNA 或 RNA 分子。下面将介绍用原位技术检测潜在感染的鼠三叉神经节或皮层神经元中的 HSV-1 RNA[16,17]。首先用 HSV-1 糖蛋白 B（gB）基因的特异寡聚核苷酸引物和地高辛标记的核苷酸原位产生地高辛标记的 DNA 分子，然后用碱性磷酸酶偶联的抗地高辛的抗体定位，并用 BCIP/NBT 显色检测。该方法可以鉴定出含有 HSV-1 转录物感染的三叉神经节及皮层神经元。

2. 材料

2.1 RT-PCR

1. 10×PCR 缓冲液 I（Applied Biosytems，Foster City，CA）。

2. PCR 反应缓冲液：10μL 的 10×PCR 缓冲液 I、2μL dNTP（浓度为 10mmol/L）、1μL 引物（100ng）、1μL Taq 聚合酶，加不含核酸酶的水至 100μL。

3. dNTP：浓度均为 10mmol/L（Promega Corp.，Madison，WI）。

4. PCR 标记缓冲液：除终体积为 99μL 外其他同 PCR 反应缓冲液，其中添加 1μL SpectrumOrange™ 或 SpectrumGreen™ dUTP。

5. 100ng/μL 引物 [随机引物（Promega Corp.）或 DOP-PCR 引物]。

6. 50nmol SpectrumOrange™ 或 SpectrumGreen™ dUTP（Vysis，Inc.，Downers Grove，IL）用 50μL 无核酸酶的水溶解则得到 1mmol/L 的溶液。在 −20℃可稳定保存 3 个月。

7. Taq 聚合酶：任何商业化的种类都可使用。但应先用合适的底物确定其最适浓度。

8. RNasin 40U/μL（RNA 酶抑制剂，Promega 公司）。

9. 逆转录酶：Superscript II 200U/μL（Gibco-BRL，Gaithersburg，MD）。

10. 5×第一链缓冲液（Gibco-BRL）。

11. 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 10U/μL（Gibco-BRL）。

12. 0.1mol/L 二硫苏糖醇（DTT）。

13. RNA 酶 H 2U/μL（Gibco-BRL）。

14. 5×第二链缓冲液（Gibco-BRL）。

15. 糖原（glycogen）：分子生物学纯度，5mg/mL（Promega 公司）。

16. 5mol/L 乙酸胺，（Sigma Chemical Co.，St. Louis，MO）。

17. 无水异丙醇（Aldrich Chemical Co.，Milwaukee，WI）。

18. 70%乙醇。

19. 无核酸酶的水。

20. 矿物油（如果需要）：浅白色（Sigma Chemical Co.）。

21. NuSieve GTG 琼脂糖（FMC BioProducts，Rockland，ME）。

22. 1×Tris-硼酸缓冲液（TBE）：45 mmol/L Tris-硼酸、1mmol/L EDTA pH 8.0，用于凝胶电泳（BioRad，Hercules，CA）。

2.2 不对称 PCR

2.2.1 缓冲液及酶

1. 10×PCR 缓冲液 I（Perkin-Elmer Applied Biosytems，Foster City，CA）。

2. PCR 反应缓冲液：10μL 的 10×PCR 缓冲液 I、1μL dNTP（各 10mmol/L）、引物对（浓度见下面）、1μL SpectrumOrange™ 或 SpectrumGreen™ dUTP（Vysis，Inc.，Downers Grove，IL）、3U 的 Taq 聚合酶，添加无核酸酶的水至 99μL。

3. 50pmol 的“过量”引物。

4. 1pmol 的“限制”引物。

5. SpectrumOrange™ 或 SpectrumGreen™ dUTP（Vysis，Inc.，Downers Grove，IL）：用 50μL 无核酸酶的水溶解则得到 1mmol/L 的溶液。在－20℃可稳定保存 3 个月。

6. Taq 聚合酶：任何商业化的种类都可使用。

7. 无核酸酶的水。

8. 矿物油（如果需要）：浅白色（Sigma Chemical Co.，St. Louis，MO）。

9. NuSieve GTG 琼脂糖（FMC BioProducts，Rockland，ME）。

10. 1×Tris-硼酸缓冲液（TBE）：45mmol/L Tris-硼酸、1mmol/L EDTA pH 8.0，用于凝胶电泳（BioRad，Hercules，CA）。

2.2.2 引物

所用引物的设计：

1. HLA-A，序列 5′TGG GAC TGA GTG GCA AGT。

2. HLA-B，序列 5′TTC ATG GTG GCC TGA GCA。

2.3 单链 RNA 探针

2.3.1 缓冲液及酶

1. 10× PCR 缓冲液 I（Perkin-Elmer Applied Biosysytems，Foster City，CA）。

2. PCR 反应缓冲液：10μL 的 10×PCR 缓冲液 I、1μL dNTP（各 10mmol/L）、引物对（浓度见下面）、1μL SpectrumOrange™ 或 SpectrumGreen™ dUTP（Vysis，Inc.，Downers Grove，IL）、3U 的 Taq 聚合酶，添加无核酸酶的水至 99μL。

3. SpectrumOrange™ 或 SpectrumGreen™ dUTP（Vysis，Inc.，Downers Grove，IL）：用 50μL 无核酸酶的水溶解则得到 1mmol/L 的溶液。在 −20℃可稳定保存 3 个月。

4. Taq 聚合酶：任何商业化的种类都可使用。

5. 矿物油（如果需要）：浅白色（Sigma Chemical Co.，St. Louis，MO）。

6. SP6 RNA 聚合酶，10U/μL（Promega Corp.，Madison，WI）。

7. 5×SP6 转录缓冲液（Promega Corp.）。

8. T7 RNA 聚合酶，10U/μL（Promega Corp.）。

9. 5×T7 转录缓冲液（Promega Corp.）。

10. 荧光 RNA 标记液，10×(Roche Biochemicals Nutley，NJ)。

11. 无核酸酶的水。

12. 体外转录标记缓冲液：2μL 荧光 RNA 标记液、4μL 的 5×转录缓冲液、2μL 特异 RNA 聚合酶，补充无核酸酶的水至 18μL。

13. 0.5mol/L EDTA，pH 8.0。

14. NuSieve GTG 琼脂糖（FMC BioProducts，Rockland，ME）。

15. 1× Tris-硼酸缓冲液（TBE）：45mmol/L Tris-硼酸、1 mmol/L EDTA pH 8.0，用于凝胶电泳（BioRad，Hercules，CA）。

2.3.2 引物

所用引物的设计：

1. SP6HLA，5′AGG GAT CCA TTT AGG TGA CAC TAT AGA ACC CGG GGC TGG GAC TGA GTG GCA AGT。

2. T7HLA，5′GGA TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA G TTC ATG GTG GCC TGA GCA。

2.4 原位 RT-PCR

1. 100ng/μL 的引物。①gB 引物序列为：5′引物 ATT-CTC-CTC-CGA-CGC-CAT-ATC-CAC-CTT；3′引物 AGA-AAG-CCC-CCA-TTG-GCC-AGG-TAG-T。②LAT 引物序列为：5′引物 GAC-AGC-AAA-AAT-CCC-GTC-AG；3′引物 ACG-AGG-AGG-GAA-AAC-AAT-AAG-GG。③磷酸甘油醛脱氢酶（GAPDH）的引物为：5′引物 ATT-GGG-GGT-AGG-AAC-ACG-GAA；3′引物 ACC-CCT-TCA-TTG-ACC-TCA-ACT-A。

2. 梯度乙醇：100%、70%和 50%的乙醇。

3. PBS：10mmol/L Na_2HPO_4、1.8mmol/L KH_2PO_4、140mmol/L NaCl、2.7mmol/L KCl，pH 7.5。

4. 二甲苯。

5. Taq 聚合酶：任何商业化的种类都可使用，但应先用合适的底物确定其最适浓度。

6. 逆转录酶：Superscript II 200U/μL。(Gibco-BRL，Gaithersburg，MD)。

7. 无 RNA 酶的 DNA 酶 I，(Gibco-BRL)。

8. NuSieve GTG 琼脂糖（FMC BioProducts，Rockland，ME)。

9. 原位 PCR 反应混合物：1×PCR 缓冲液 II（Applied Biosystems，Foster City，CA)，1mmol/L $MgCl_2$、1×地高辛 DNA 标记混合物（Roche Molecular Biochemicals)、100ng 引物混合物、50%的甘油及 1μL 的 Taq 聚合酶。

10. RNasin 40U/μL（Promega Corp.)。

11. DNA 酶消化缓冲液：1mmol/L NaCl，10mmol/L Tris-HCl，pH 7.5。

12. 原位逆转录反应缓冲液：每 100μL Superscript II 反应缓冲液中含有 10U 的 Superscript II（Gibco-BRL)、5U 的 RNasin、5μL 的寡聚 dT 引物(100ng/mL)、10mmol/L DTT 和 1mmol/L dNTP。

13. 碱性磷酸酶偶联的抗地高辛抗体（Roche Molecular Biochemicals)。

14. BCIP/NBT（Vector Lab.)。

3. 实验方法

3.1 RT-PCR

3.1.1 cDNA 的合成

1. 反应之前将 RNA 样品在 90℃、5min 变性。

2. 向 4μL 5×第一链缓冲液中加入 1μg poly（A)$^+$ RNA、2μL 的 0.1mol/L

DTT、1μL 的 10mmol/L dNTP 混合物、100ng 引物和 1μL 的 Superscript™ II 逆转录酶（200U/μL）。

3. 37℃孵育 60min。

4. 向反应混合物中加入 92μL 无核酸酶的水、30μL 的 5×第二链缓冲液、3μL 10mmol/L 的 dNTP、4μL 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I（10U/μL）和 1μL 的 RNA 酶 H（2U/μL），在 16℃放置 2h。

5. 加入 2μL 糖原（5mg/mL）、0.4 倍体积的 5mol/L 乙酸胺及 2 倍最终体积的无水异丙醇。

6. 用微型离心机的最大转数室温离心 10min，弃上清。

7. 用 0.5mL 冰冷 70%的乙醇洗涤沉淀并气干。

8. 用 10μL 无核酸酶的水重悬沉淀。

3.1.2 cDNA 的扩增及标记

根据第 2 章 3.3.1 及 3.3.2 中所叙述的步骤进行双链 cDNA 的扩增及标记，或者用基因特异引物及合适的 PCR 扩增/标记条件（见注释 1～5）。

3.2 不对称 PCR

用下面的条件在 PCR 反应缓冲液中扩增 1μg 质粒 DNA（1mg/mL）：94℃、15s，55℃、15s 进行 40 个循环，然后 72℃延伸 10min，最后在 4℃保温。取 10μL 用 1%琼脂糖进行电泳。该反应所得到的标记单链 DNA 在 1.0～2.0μg 之间（见注释 6～8）。

3.3 单链 RNA 探针

3.3.1 DNA 的扩增

用下面的条件在 PCR 反应缓冲液中扩增 1μg 质粒 DNA（1mg/mL）：94℃、15s，55℃、15s 进行 40 个循环，然后 72℃延伸 10min，最后在 4℃保温。

3.3.2 PCR 产物的体外转录

将 2μL 的 cDNA 在体外转录标记缓冲液中 37℃、2h 转录，然后在冰上加入 2μL 的 0.5mol/L EDTA，pH 8.0 来终止该反应。用无核酸酶的水补充体积至 100μL，直接用于 FISH（见注释 9～11）。

3.4 原位 RT PCR

1. 用 4%多聚甲醛灌注动物，石蜡包埋组织，用切片机制作切片。

2. 用二甲苯将玻片上的 6μm 组织块脱蜡，每次 2min，共 3 次。

3. 按下面顺序连续用梯度乙醇将组织进行水合：100%乙醇 2 次，每次 2min；70%乙醇 2min；50%乙醇 2min。

4. 用 pH 7.5 的 PBS 洗涤组织块 2 次，每次 5min。

5. 用含 1% HCl 的 PBS 透化处理组织块 5min，然后用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min（见注释 12）。

6. 在 200μL DNA 酶酶切缓冲液中，用不含 RNA 酶的 DNA 酶 400U 及 10U 的 RNasin 处理组织块 37℃过夜（见注释 12）。

7. 用不含 RNA 酶的 PBS 冲洗样品，去除过剩的 DNA 酶。

8. 将标本在 100μL 原位逆转录酶反应缓冲液中 37℃，60min 进行逆转录。

9. 用不含 RNA 酶的 PBS 反复冲洗标本。

10. 用 PCR 缓冲液 II 冲洗标本 3 次，每次 5min。

11. 标本在切片上滴加 25μL 原位 PCR 反应混合物，覆盖盖玻片，用指甲油封片，注意不要让指甲油渗漏进反应混合物中。

12. 在 BioOven III Thermal Cycler（BioTherm Corp. St. John Associates, Inc., Beltsville, MD 20705）上进行两个阶段 PCR 扩增：第一阶段，92℃、1min，54℃、30s，72℃、30s，共 3 个循环；第二阶段，92℃、15s，54℃、15s，72℃、15s 共 25 个循环（见注释 13～15）。

13. PCR 完成后，移去盖玻片，用 1×SSC（每次 5min，2 次），含 50%的甲酰胺的 1×SSC（每次 15min，3 次，56℃）及 1×SSC（每次 15min，2 次）连续洗涤脱标本。

14. 用 Tris 盐（pH 7.5）及 5%的正常羊血清洗脱后，用碱性磷酸酶偶联的抗地高辛抗体（1∶250）处理地高辛标记的 DNA，并用 BCIP/NBT 显色。

15. 肉眼观察监测颜色的变化，一般在 30min 后用 0.1mol/L Tris-HCl（pH 7.5）和 1mmol/L EDTA 终止反应。

4. 注释

1. 防止因 PCR 试剂污染导致的非特异扩增，尽可能用最好的试剂，并将这些试剂专门用于 PCR。我们通常将溶液分装，并将其在－20℃冻存。使用防止溶胶产生的吸头，减少交叉污染，并在实验室专门开辟一块地方用于 PCR 操作。

2. 如果可能的话，应在不同房间准备 DNA 和 RNA 样品。另外在每次进行 PCR 实验的时候绝对有必要有一个阴性对照样品（也就是没有目标序列的样品）。

3. 用特定目标样品来确定 Taq 酶的用量。过多的酶会导致非特异性背景。

4. 确定引物的使用浓度为 50ng～1μg。

5. 改变循环数以确定给出最好的信噪比的循环数。

6. 为了得到最好的结果，应事先确定引物间合适的比例。

7. 如果 40 个循环的不对称 PCR 反应仍不能有效的得到单链 DNA。有时可从 40 个循环反应液里面取出一部分进行新一轮的不对称 PCR 反应。

8. 增加单链 DNA 产量的另外一个方法是在正常 PCR 反应时将 Taq 酶用量加倍。一般每个反应酶的用量为 3U。

9. 和前面一样，标记转录物的质量可以用 1%琼脂糖凝胶电泳检测。

10. 不需要用溴化乙锭对凝胶染色，因为荧光标记的 cRNA 在紫外光下自行发荧光。

11. 进行 RNA 操作时应遵守常规的注意事项。

12. 用该方法获得好结果最关键的步骤是确定透化组织及 DNA 酶处理组织的最佳时间。

13. 应包括未加逆转录酶的对照样品，只是不应产生任何阳性信号。

14. 应包括在逆转录前用 RNA 酶处理的对照样品，只是不应产生任何阳性信号。进行此操作的简单方法是在 DNA 酶酶切时加入 RNA 酶 I（400U）过夜处理。

15. 应包括无特异性引物对照样品，进行原位 PCR 不应产生任何阳性信号。

（赵宝锋 译，刘青杰 校）

参考文献

1. Mcknight, S. L. and Kingsbury, R. (1982) Transcriptional control signals of a eukaryotic protein-coding gene. *Science* **217,** 316–324.
2. Graves, B. J., Eisenberg, S. P., Coen, D. M., and Mcknight, S. L. (1985) Alternate utilization of two regulatory domains within the Moloney murine sarcoma virus long terminal repeat. *Mol. Cell Biol.* **5,** 1959–1968.
3. Jones, K. A., Yamamoto, K. R., and Tjian, R. (1985) Two distinct transcription factors bind to the HSV thymidine kinase promoter in vitro. *Cell* **42,** 559–572.
4. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual.* Second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
5. Schenborn, E. T. and Mierendorf, R. C., Jr. (1985) A novel transcription property of SP6 and T7 RNA polymerases: Dependence on template structure. *Nucl. Acids Res.* **13,** 6223–6236.
6. Milligan, J. F., Groebe, D. R., Witherell, G. W., and Uhlenbeck, O. C. (1987) Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucl. Acids Res.* **15,** 8783–8798.
7. Rosenberg, A. H., Lade, B. N., Chui, D. S., Lin, S. W., Dunn, J. J., and Studier, F. W. (1987) Vectors for selective expression of cloned DNAs by T7 RNA polymerase. *Gene* **56,** 125–135.
8. Milligan, J. F. and Uhlenbeck, O. C. (1989) Synthesis of small RNAs using T7 RNA polymerase. *Methods Enzymol.* **180,** 51–62.
9. Veres, G., Gibbs, R. A., Scherer, S. E., and Caskey, C. T. (1987) The molecular basis of

the sparse fur mouse mutation. *Science* **237,** 415–417.

10. Kawasaki, E. S. (1990) Amplification of RNA in *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White, T. J., eds.), Academic Press, New York, pp. 21–27.
11. Gyllensten, U. B. and Erlich, H. A. (1988) Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85,** 7652–7656.
12. McCabe, P. C. (1990) Production of single stranded DNA by asymmetric PCR, in *PCR Protocols: A guide to Methods and Applications* (Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J., and White, T. J., eds.), Academic Press, New York, pp. 76–83.
13. Ramakrishnan, R., Levine, M., and Fink, D. J. (1994) PCR-based analysis of herpes simplex virus type 1 latency in the rat trigeminal ganglion established with a ribonucleotide reductase-deficient mutant. *J. Virol.* **68,** 7083–7091.
14. Gressens, P. and Martin, J. R. (1994) In situ polymerase chain reaction: localization of HSV-2 DNA sequences in infections of the nervous system. *J. Virol. Methods* **46,** 61–83.
15. Nuovo, G. J. (1992) *PCR In Situ Hybridization: Protocols and Applications*. Raven Press, New York.
16. Ramakrishnan, R., Poliani, P. L., Levine, M., Glorioso, J. C., and Fink, D. J. (1996) Detection of herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript expression in trigeminal ganglia by in situ reverse transcriptase PCR. *J. Virol.* **70,** 6519–6523.
17. Ramakrishnan, R., Poliani, P. L., Goins, W. F., Fink, D. J., and Glorioso, J. C. (1996) Studies of LAP1 and LAP2 function in LAT expression in vivo, in *Proceedings of the 21st International Herpesvirus Workshop*, Dekalb, IL.

第 4 章　FISH 基本技术和问题解决

Sue Van Stedum，Walter King

1. 引言

荧光原位杂交（FISH）技术可以对染色体、细胞和组织中的特异核酸序列进行检测。明确检测到全染色体或染色体某个特定区域的结构或拷贝数发生改变是人类疾病重要的预兆因子。应用于染色体分析的 FISH 可以分为中期 FISH 和间期 FISH，两者的主要区别在预处理和杂交前的细胞制备工作。用于中期分析的细胞培养方法与标准核型分析的细胞培养相同。FISH 在细胞结构较少或者含有不同种群细胞的标本中最有效。FISH 技术适用于多种标本类型，特别是档案标本，如福尔马林固定石蜡包埋的组织。然而，探针杂交的成功与否决定于标本的制备。在间期 FISH 中，用各种增加靶细胞或组织通透性但保持重要组织形态结构的试剂预先处理，大大提高了探针的杂交效率。另外，预处理能减少组织或细胞的自发荧光背景。充分了解标本预处理过程的原理有助于解决试验中出现的问题。标本 DNA 一旦可用于杂交，获得最理想信号的实验条件一般不要改动。本章旨在阐述关于标本制备和杂交方面 FISH 显著的特征。

1.1　间期细胞和中期染色体分析

荧光标记的 DNA 探针能够和处于不同细胞周期的间期和中期细胞进行杂交。间期 FISH 的优点在于能快速筛查大量细胞核，不需进行细胞培养和中期染色体制备。在有丝分裂指数低的标本（如大多数的实体瘤）研究中也发挥很大作用。间期 FISH 的主要局限性在于不能发现未知的染色体结构改变。相反，中期染色体 FISH 分析能对发生结构改变的特定染色体区域进行直观的分析，尤其是用染色体涂染探针、着丝粒特异性和位点特异性探针进行多种分析。基因组的结构改变如易位、倒位和标记染色体通常可以用中期 FISH 进行鉴别。染色体显带技术和 FISH 技术联合应用最适于对发现的各种畸变进行证实。

间期细胞和中期染色体标本的质量是保证 FISH 成功非常关键的因素。全面了解作为研究对象的组织和标本制备技术是得到高质量结果的第一步。每个实验室在正式实验前都应该用对照标本来验证探针的性能。

1.2 标本制备

1.2.1 用培养的细胞进行标本制备

浓缩染色体的分散是在适合的干燥条件下，将细胞悬液准确滴到在载玻片上而完成的（见注释 1）。控制温度和相对湿度，得到理想的染色体分散程度和形态、最少的细胞质残留。配备一台相差显微镜进行镜检，检查染色体质量。中期染色体应该呈中等灰色、轮廓清楚、分散良好、很少或没有肉眼可见的细胞质。相差显微镜下，染色体不能折射光线。如果染色体不满足上述特征，通过调节温度或湿度水平改进标本制备条件；如果需要还可调节细胞悬液的浓度。这些措施目的在于得到最理想的固定液蒸发速度。晾干后，片子在室温下老化过夜。如需长期保存，应和干燥剂一起保存在−20℃冰箱中。

1.2.2 用新鲜样品进行标本制备

可以用下面列出两种标准化方法的任何一种对培养的染色体标本进行制片，而新鲜样品的染色体制备通常较少受到温度和湿度的影响。比起培养细胞，未经过培养的细胞，如羊水细胞、鳞状细胞和上皮细胞含有更多的细胞质，反过来这些细胞质阻碍了胀大的细胞核在载玻片上的伸展。因此固定的细胞悬液只是简单的滴到载玻片上。可以用多余的标本悬液滴片，在显微镜下观察直到得到理想的细胞结构。细胞离心也是一种常见的将细胞固着在载玻片上的方法。如果滴好的染色体当天就进行杂交，和培养的标本一样需要进行人工老化。

1.3 标本预处理

1.3.1 新鲜细胞的预处理

中期染色体 DNA 的可及性在滴片过程中优化，通常不需要进行预处理。对于间期细胞，老化后将细胞在蛋白酶溶液中温浴可去除胞间碎片并可进一步减少细胞质，在含细胞质非常多的细胞类型（如羊水细胞）中这一步骤尤为重要。酶处理之后细胞浸于 1%的甲醛溶液中以保持细胞核的形态，然后标本浸于系列乙醇中对细胞进行脱水以备变性。不管是培养细胞还是非培养细胞，每个标本的预处理程序都是基本相同的，由于羊水细胞较其他类型细胞脆弱，因而推荐使用较低浓度的蛋白酶溶液。许多标本尤其是新鲜培养的细胞或淋巴细胞一般不需要预处理，然而若片子上留有过多胞质或背景碎片则须执行标准的预处理程序。对未经培养的骨髓标本进行预处理通常是有益的，这样做可减少背景噪声和提高特异信号强度。蛋白酶预处理前在 1%甲醛溶液中固定可使核信号更紧密。

1.3.2 石蜡包埋的实体瘤的预处理

新切除的标本应该尽快在 10%福尔马林缓冲液中进行固定。用于 FISH 的标本固定 24～48h 效果最佳，固定过度或固定不足都会造成信号微弱或消失，切片通常切成 4～6μm，固定于带正电核的片子上（如经过氨基硅烷化处理的片子）气干。片子可直接使用或室温放置一段时间，使用前滴有标本的片子需在 56℃的烤箱或电热板上烘烤过夜以增强组织的附着性。福尔马林的固定能力比酸或乙醇强，因此福尔马林固定的标本要取得理想的杂交效果需要进行更有力的蛋白酶消化。

石蜡包埋的标本进行 FISH 须先将石蜡除去。已有商业化的预处理试剂盒可用于进行 FISH 分析的组织标本制备，样品在系列二甲苯或 Hemo-D 溶液中去除石蜡，然后在系列乙醇中脱水，然后标本先用盐酸处理，接着在较高的温度条件下用异硫氰酸钠溶液中处理，最后进行蛋白酶消化。

1.4 杂交和洗脱

标记的 DNA 与部分消化的染色质特异并有效的杂交过程包括：靶序列和探针 DNA 的变性，在与非特异性重复序列同源的未标记封闭 DNA 存在条件下探针的杂交、去除未杂交或非特异性杂交或结合的探针。除了有甲酰胺（一种离液剂，可降低双链核酸的熔解温度）存在外[1]，FISH 的变性条件和纯化 DNA 的变性条件相似。对通常含重复序列的长基因组 DNA 片段制备的探针进行杂交需要使用过量的封闭 DNA。通过使用封闭 DNA 抑制探针和非靶序列的杂交构成了 FISH 特异性的机制。一次杂交中，10μL 杂交体系探针用量范围在 10～900ng，近着丝粒区域高度重复序列需要的探针量更少，通常这一区域跨度为成百上千碱基对。因探针复杂度不同，有些杂交缓冲液包含像硫酸葡聚糖这样的促进剂。

1.5 计数

在对一张杂交标本进行分析前，操作者除了需要了解检测样品的特点以外还必须清楚探针的质量特点。熟悉每个探针的大小、形状和荧光强度对准确评价杂交结果非常重要。信号必须明亮、清晰和易于计数，背景应无荧光颗粒，探针不能交叉杂交于其他位点。操作者需要熟悉所检测标本的细胞群体，能够知道何时包括或不包括某种细胞类型，或何时为特定肿瘤而浏览细胞群体。特定的探针易与处于细胞周期间期或中期的靶细胞杂交，操作者应根据情况相应地调整观察重点。

2. 材料

2.1 制备培养的中期细胞标本

1. 水浴锅。
2. 增湿器。
3. 塑料保鲜膜。
4. 湿度计。
5. 试管架。
6. Carnoy 固定液（见注释 2）：冷（−20℃）甲醇∶冰乙酸=3∶1。
7. 载玻片。
8. 70%乙醇。
9. 水。
10. 实验用无尘纸。
11. 细胞悬液。
12. 相差显微镜。

2.2 使用可调节细胞遗传用干燥箱制备培养细胞标本

1. Thermotron CDS-5 型细胞遗传用干燥箱（Holland，MI）。
2. 载玻片。
3. 70%乙醇。
4. 实验室用无尘纸。
5. 细胞悬液。
6. 相差显微镜。

2.3 制备原代羊水细胞标本

1. 固定的细胞悬液。
2. 载玻片。
3. 70%乙醇。
4. 实验室用无尘纸。
5. 相差显微镜。

2.4 制备尿道上皮细胞标本

1. 固定的细胞悬液。
2. 6mm12孔加盖的片子（Shandon Inc.，Pittsburgh，PA）。
3. 70%乙醇。
4. 实验室用无尘纸。
5. 相差显微镜。

2.5 新鲜细胞的预处理

1. 2×SSC。
2. 预热的胃蛋白酶工作液（0.5mg/mL胃蛋白酶/0.01mol/L HCl）。
3. 磷酸盐缓冲溶液（PBS）。
4. 处理后固定溶液：0.95% 甲醛、1mL 37%甲醛、0.18g $MgCl_2$ 和39mL PBS。
5. 100%乙醇。
6. 85%乙醇。
7. 70%乙醇。

2.6 石蜡标本的预处理

1. 石蜡处理的片子在56℃下烘焙过夜。
2. 钻石笔。
3. 温度设置为45～50℃的玻片电热板。
4. Hemo-De清理试剂（Fisher Product No. 15-182-507A）。
5. 100%乙醇。
6. 0.2mol/L HCl。
7. 纯净水（蒸馏水或去离子水或Milli-Q级的水）。
8. 洗脱缓冲液：2×SSC，pH 7.0。
9. 37℃和80℃的水浴锅。
10. 预处理溶液：1mol/L NaSCN。
11. 蛋白酶溶液：0.5mg/mL胃蛋白酶（2500～3000U/mg）溶于pH 2.0的NaCl。
12. 中性缓冲福尔马林溶液（溶于PBS的4%甲醛）。

2.7 杂交和洗脱

1. 计划杂交的标本。
2. DNA 探针。
3. 镊子。
4. 变性液：70%甲酰胺/2×SSC，pH 7.0～8.0。
5. 70%、85%和 100%乙醇。
6. 73℃水浴锅。
7. 22mm×22mm 盖玻片。
8. 橡皮泥。
9. 杂交湿盒（置有潮湿吸水纸的密闭容器）。
10. 37℃温箱。
11. 杂交后洗脱液：非福尔马林固定的标本用 0.4×SSC/0.3% NP-40 洗脱，福尔马林固定的石蜡包埋标本用 2×SSC/0.3% NP-40 洗脱。
12. DAPI 复染液。

3. 方法

3.1 制备培养的中期细胞标本

1. 在一个独立小室里放置一个水浴锅和一台增湿器。湿度应大约 50%，如果房间湿度计显示低于 45%，则应使用加湿器。

2. 预热水浴锅至 67℃±2℃，在水浴锅中央放置试管架以使碰不到水浴锅边缘，整个操作过程保持水位刚好在试管架顶端之下。

3. 用 Carnoy 固定液调整细胞悬液的浓度，使悬液轻度混浊即可（见注释 3）。

4. 用 70%乙醇清洗载玻片的两面，用无尘纸将玻片擦干。

5. 将清洗过的玻片浸在一缸水中，倾斜载玻片使水均匀覆盖在片子上表面。

6. 立刻将片子移至水浴锅上方，拿一支 2～4in（1in＝2.54cm）的巴斯德吸管，在片子上方沿片子长边滴 3 或 4 滴细胞悬液。

7. 将片子放置在水浴中试管架的顶端，有标本面向上，让片子干燥5～10min。

8. 将片子拿开，在相差显微镜下观察，必要时调整滴片条件。

3.2 使用可调节细胞遗传干燥器制备中期染色体标本（见注释4）

1. 打开温差电偶真空计，将温度设定为22℃和相对湿度设定为44%，并使之达到稳定状态。

2. 用Carnoy固定液调整细胞浓度，使悬液呈微混浊状（见注释5）。

3. 用70%乙醇清洗载玻片两面，并用无尘纸擦干，将片子放置在温差电偶真空计的内表面。

4. 握住一支2～4in巴斯德吸管，在片子正上方沿着片子的长边滴3或4滴细胞悬液。

5. 观察悬液干燥的情形。悬液在45～60s内干燥的情况下制备的标本质量一般较好。

6. 在相差显微镜下观察，必要时调整滴片条件。

3.3 制备未经过培养的标本（见注释6）

1. 小心重悬固定的细胞。

2. 每个杂交区域滴15～20μL细胞悬液（通常每张片子滴两个区域）

3. 气干标本。

4. 在相差显微镜下检验细胞密度，如有必要重复2和3步。

5. 过夜老化或在73℃的2×SSC溶液中保温2min（见注释7）。

3.4 制备尿道上皮细胞标本

1. 小心重悬细胞并分别滴3μL、10μL和30μL悬液在加盖载玻片的3个孔中。

2. 气干标本。

3. 确定哪个样品的细胞密度最佳，即拥有足够数量的非重叠细胞。

4. 在相差显微镜下面观察细胞密度，并选择合适的孔进行杂交。

5. 过夜老化或在73℃的2×SSC溶液中保温2min（见注释7）。

3.5 新鲜细胞的预处理

1. 将标本在73℃的2×SSC中浸泡2min。

2. 将标本在37℃的胃蛋白酶工作液中浸泡10min。

3. 将标本在室温的 PBS 中洗 5min。

4. 室温下将标本在处理后固定液中放置 5min。

5. 将标本在室温的 PBS 中洗 5min。

6. 将标本自然风干。

7. 将标本在 70%的乙醇中室温下浸 1min。

8. 将标本在 85%的乙醇中室温下浸 1min。

9. 将标本在 100%的乙醇中室温下浸 1min。

10. 可以进行标本变性。

3.6 石蜡标本的预处理（见注释 8）

1. 用钻石笔标出待杂交的石蜡区域。

2. 室温下将标本在 Hemo-De 清理试剂中浸 10min。

3. 将标本在 Hemo-De 清理试剂中重复洗 2 次，每次都使用新鲜的 Hemo-De 清理试剂。

4. 室温下，将标本在 100%乙醇中脱水 5min。

5. 换新的乙醇重复步骤 4。

6. 将标本自然风干或将片子在 45～50℃的片子加热板上放置 2～5min。

7. 将标本在 0.2mol/L HCl 中浸 20min（见注释 9）。

8. 将标本在纯水中浸 3min。

9. 将标本在洗脱缓冲液中浸 3min。

10. 将标本在 80℃预处理液中浸 30min。

11. 将标本在纯水中浸 1min。

12. 将标本在洗脱缓冲液中浸 5min。

13. 重复在洗脱缓冲液中清洗步骤。

14. 用纸巾从载玻片边缘蘸去多余的洗脱缓冲液。

15. 将标本在 37℃的蛋白酶溶液中浸泡 10min（见注释 10）。

16. 将标本在洗脱缓冲液中浸 5min。

17. 重复在洗脱缓冲液中清洗步骤。

18. 将标本在 45～50℃的标本电热板上干燥 2～5min。

19. 将标本在中性福尔马林缓冲液中室温浸泡 10min（见注释 11）。

20. 将标本在洗脱缓冲液中浸 5min。

21. 重复在洗脱缓冲液中清洗步骤。

22. 将标本在 45～50℃的标本电热板上干燥 2～5min。

23. 可继续进行杂交操作程序。

3.7 杂交和洗脱

一定要协调好准备探针的时间和标本变性时间，以便同时完成以备杂交。

1. 将标本在 73℃变性液中浸泡 5min。一个染缸内一次最多变性 4～6 张载玻片（见注释 12）。

2. 将标本浸在室温的 70%乙醇中 1min。

3. 将标本浸在室温的 85%乙醇中 1min。

4. 将标本浸在室温的 100%乙醇中 1min。

5. 用吸水纸从载玻片的边缘吸取多余的乙醇并用纸巾将玻片背面擦干。

6. 将探针分装到一个微量离心管中并盖紧，将探针在 73℃水浴中变性 5min。

7. 在标本上的目标区域加 3～10μL（根据样品区域而定）探针混合液（见注释 13）。

8. 立刻在探针上覆盖以 22mm×22mm 或一个 12mm 圆形（本章 3.4 泌尿上皮细胞杂交）盖玻片使探针均匀分布。

9. 用橡皮泥封住盖玻片周边。

10. 将标本放在 37℃预热的湿盒中。

11. 将杂交标本在 37℃保温过夜（14～18h，见注释 14）。

12. 用镊子轻轻撕除封片胶。

13. 室温下，将标本浸在杂交后洗脱缓冲液中并洗掉盖玻片。

14. 从载玻片的一端吸除过量的液体。

15. 将载玻片在 73℃的杂交后洗脱缓冲液中浸洗 2min。每个染缸一次不得洗脱超过 4～6 张非福尔马林固定的标本，在 2×SSC/0.1% NP-40 中室温浸洗 1min（见注释 14）。

16. 取出片子，将片子垂直放置于暗处风干。

17. 加 10μL DAPI 复染液到目标区域并盖上 22mm×22mm 盖玻片。

18. 杂交后标本置于暗处保存。不使用时于－20℃保存。

3.8 间期细胞的信号计数

使用下列各项标准评估片子是否合适（见注释 15～20）。

1. 探针信号强度：信号应该是明亮、清晰和易于评估。信号应该是紧密的椭圆形或线状、弥散的椭圆形。

2. 背景：背景应该呈深暗或黑色，很少有荧光颗粒或是雾状。

3. 靶信号的识别：使用指定的滤光片。调整焦距，而且要熟悉靶信号和背景噪声（碎片）的大小和形状。

4. 使用40×目镜，扫描一些区域估计细胞类型的异质性。选择一个核分布均匀的区域，避开靶信号弱的区域。

5. 使用63×或100×目镜，开始分析选定区域左上象限，并从左向右扫描，依照指导原则在每个清晰可辨的间期细胞核边界内计数信号。

6. 上下调节焦距找到核内所有信号。

7. 大小相同，相距小于或等于单个信号直径可计为两个信号。

8. 不要对没有信号或当使用两种或更多不同荧光素只有一种颜色信号的核进行计数。只记入那些每种颜色有一个或多个 FISH 信号的核。

4. 注释

4.1 标本制备

1. 用于中期或间期分析的低渗胀大细胞的最理想分散程度是核和胞质的平铺，这一平铺过程受固定液在载玻片上的蒸发和铺展速率的调节[2]。这在中期染色体标本制备中尤其重要，由于过度铺展将导致临近细胞的染色体重叠，铺展不充分将导致染色体短小并互相聚集重叠。

2. 拥有最佳的风干效果是各细胞遗传学实验室广泛使用 Carnoy 固定液的主要原因。固定液需慢慢加入以避免胞膜破裂导致染色体丢失。人们倾向于使用冷的固定液，加速固定效果并维持细胞形态。Carnoy 固定液应在使用之前新鲜配制，由于随时间延长某些成分稳定性降低，减弱固定效果。

3. 标本可以直接从固定的细胞悬液制备，也可从－20℃保存较长时间的细胞悬液中制备。在制片之前通常用固定液清洗几次细胞悬液以去除可能影响制片效果和 FISH 结果评价的细胞碎片。

4. 标本制备过程的可重复性对 FISH 实验的成功尤为关键。各实验室标本制备方法各不相同而且很有创造性，时常需要根据每日和季节的天气变化改变滴片条件。标本制备和细胞铺展的基础是细胞滴到玻片上后的干燥速率。温度和相对湿度对这一过程也有深远影响，因此各实验室经常尝试尽可能多的控制这些参数。许多实验室已经在他们的日常工作中引入 Thermotron CDS-5 细胞遗传干燥器。Thermotron 是一个可控制相对湿度和温度的独立单元，可获得恒定的最佳染色体铺展效果[2]。自动密封的臂端设置使得操作者可以在 Thermotron 之内的可控制的环境中制备标本。还有很多的其他条件影响标本的制备过程。

5. 细胞悬液的密度、载玻片的类型、空气流动、固定液的成分配比、细胞

类型及培养和收获技术对整个过程都有影响。保持操作程序的一致性是控制标本制备过程的最佳方法。

6. 像细胞离心的许多程序，包括将样品直接滴到片子上随后进行固定。载玻片上的标本在室温下风干并尽快用适合于 FISH 的溶液中固定，通常使用 Carnoy 固定液和 95%的乙醇。标本在染色缸内的固定液中浸泡 10min，或用一系列的固定液冲洗。标本老化后可直接用于 FISH 或储存于－20℃条件下。

7. 老化程序被理解为固定作用的延续。这一步骤在标本制备当天进行杂交的情况下尤为重要，新鲜制备的标本未老化就进行杂交经常变性过度。如果标本制备的当天进行杂交，可将标本在 73℃的 2×SSC 溶液中浸泡 2min，或者可将标本在 90℃的片子加热器上老化。然而在进行 FISH 之前标本不能过度加热，此举可导致探针信号减少。

4.2 标本预处理

8. 固定液

适用于 FISH 的固定液：

- 10%福尔马林缓冲液
- 多聚甲醛
- Karnovsky 固定液（16%多聚甲醛，50%戊二醛）

FISH 不适用的固定液：

- Bouin 固定液
- B5 固定液
- 酸性固定液（如苦味酸）
- Zenker 固定液
- 乙醇（单独使用时）
- 氯化汞
- 甲醛/锌固定液
- Hollande 固定液

9. 出现不理想的 FISH 结果很难进行问题分析，由于从标本获得至 FISH 分析这一过程所包括的中间环节较多。适当的准备、包埋和切片技术要依所研究的组织类型而定，同时在此过程中引入多种变量[3]。标本的复杂性加大了处理不同组织类型标本、细胞外物质和细胞质的量所遇到的困难。盐酸和异硫氰酸盐处理可破坏交联的组蛋白键，借此提高随后的酶消化效率[4]。

10. 酶消化通常使用胃蛋白酶或蛋白酶 K，使用溶于 0.2mol/L HCl 的 1.5mg/mL 的胃蛋白酶溶液可降低背景荧光，提高信号强度。蛋白酶 K 活性要强得多，使用时必须小心，避免过度消化而导致组织或细胞结构破坏或 DNA 丢失。优化细胞核的酶消化处理条件对实验成功尤为重要。一些组织更耐消化从而较难用 FISH 进行分析。通常耐消化与长时间的福尔马林固定或组织的细胞组成有关。难消化的样品可长时间保温或用高浓度的异硫氰酸钠预处理。而

且，酶浓度和消化时间的长度很重要。如果标本消化不足，自发荧光将会变成棘手的问题并造成信号拷贝数的低估。组织的过度消化将会降低信号强度并破坏核的形态。

11. 样品在进行 FISH 之前须用 10%的福尔马林缓冲液固定以避免变性和杂交时组织破坏。预处理程序耗时，但对于获得好的 FISH 结果很重要。自动化的预处理步骤据报道可获得更优的 FISH 结果和更高的稳定性[5]，节省劳动力和可成批处理标本也是它的显著优点。

4.3 杂交和洗脱

12. 虽然煮沸 TE 探针溶液可进行变性，但为了更好地保持组织、细胞和染色体的形态应采用更温和的一些方法[6]。染色质内 DNA 变性程度高低还依赖于对 T_m 值这一参数的充分理解，T_m 被定义为 50%的 DNA 呈单链状态的温度。T_m 值的大小依赖于 GC 含量、单价阳离子浓度和双链长度[7]。样品变性温度须远远超过 T_m 值，使近 100% 的 DNA 呈单链状态，典型的变性条件是在 70～75℃的 50%～55% 甲酰胺/2×SSC 溶液。通常探针和样品同时在玻片上变性，这就提供了快速形成杂合双链更加有利的动力学条件。如果变性条件远远高于这些条件，可产生广泛的斑状杂交式样，这是紧密的 DNA-组蛋白结构解螺旋的结果。充分固定可在某种程度上避免此种状况。相反，如果 DNA 链变性不充分，就会产生少量或无杂交信号的结果。

13. 封闭 DNA 的性质不同取决于探针的复杂程度。高重复序列 DNA 探针，如着丝粒或近着丝粒 DNA 须在 10～100 倍的过量人类基因组总 DNA 存在下进行杂交。如果探针包含某染色体臂特定区域的单一序列，须在含相似量的过量高度重复 DNA 的情况下进行杂交；这种高度重复 DNA，即 Cot-1 DNA，它由高度重复的 α 序列和中度重复序列（如 Alu 重复序列家族）组成[8,9]。Alu 重复序列家族存在于所有染色体实际上也存在于所有用来制备探针的基因组 DNA 片段中。

14. 杂交时间的长短由探针序列的复杂性而定。由相当大一部分为单一序列的探针通常需要 37℃过夜，而包含着丝粒或着丝粒周边围卫星序列的探针只需要在 37～42℃杂交几个小时。为了区分出极相关的重复序列可以稍稍改变杂交温度，不过可通过高严紧度洗脱有效消除交叉杂交。石蜡包埋的标本使用高盐洗脱液即可达到与非石蜡包埋的标本在较高严紧度洗脱相似的特异性，这是因为福尔马林固定标本的探针与靶杂交体的熔点较低，原因可能在于降解使靶序列太短或杂交区域蛋白质的稳定存在使杂交体不稳定。

4.4 计数

15. 指导方针

●=橙色探针　　　　　　　　○=绿色探针

1		核相互重叠，两个核都不能看清所有区域，但信号并不在重叠区域内，每个核内都有两个橙色信号两个绿色信号
2		计为两个橙色信号和两个绿色信号，其中一个橙色信号是弥散的
3		不要计数。所有核都重叠在一起，都不能看清所有区域，且有些信号在重叠区域内
4		计为两个橙色信号和两个绿色信号，其中一个橙色信号为分裂信号
5		计为一个橙色信号和两个绿色信号，其中一个绿色信号和橙色信号为分裂信号
6		计为两个橙色信号和一个绿色信号
7		计为三个橙色信号和一个绿色信号
8		计为四个橙色信号和两个绿色信号

16. 为了确定 FISH 的充分性在实验中设立对照尤为重要。每次进行 FISH 都得设立对照，包括阴性、阳性对照，最理想的对照是接近为诊断而切除的标本。对照标本须在待检标本正式实验前进行验证，如果对照标本质量符合要求，该标本须进行计数并与已知的值进行对比来确定计数准确性。如果对照标本符合标准要求，但计数值超越特定范围，则有可能是计数有误，须对同一张片子进行独立的、重复性评价。如果对照分析失败、杂交信号很难解释或没有足够的细胞以供分析，则不能报告 FISH 结果。

17. 对石蜡包埋的肿瘤样品，使用25×的目镜浏览杂交区域确定感兴趣的靶点（肿瘤细胞通过HE染色来鉴别），并避开坏死的区域和核边界模糊的区域。跳过那些信号需要主观判断的核，跳过信号强度弱、有非特异信号或背景高的核。

18. 跳过复染不充分而不能确定边界的核，只计数那些有确切信号的核。只计数在肿瘤细胞之内的信号，肿瘤细胞一般比正常细胞、淋巴细胞和上皮细胞大。通过HE染色的同一组织块的第十张片子来确定靶区域。进行FISH分析后在盖玻片上标出这些区域，继续进行这一步骤直至计数并分析60个核。

19. 对于单一细胞悬液样品，选择一个样品分散稀疏的区域，很少有间期核或中期分裂相的重叠，并且在一个视野内可看到几个间期核或中期分裂相。避开那些细胞密集、相互重叠或单个核的边界难以确认的区域。选出需与进行的分析具特异性的感兴趣区域。

20. 如果使用的荧光素不止一种，需要进一步考虑分辨随机存在的紧邻信号，这种信号往往融合在一起形成混合色。在某些情况下颜色融合表示有易位事件发生。在其他情况下，通过使用特异于每种荧光素的滤光片来分辨信号。

（马　芬 译，刘青杰 校）

参考文献

1. Trask, B., Pinkel, D. (1990) Fluorescence in situ hybridization with DNA probes. *Methods Cell Biol.* **33,** 383–400.
2. Spurbeck, J. L., Zinsmeister, A. R., Meyer, K. J., and Jalal, S. M. (1996) Dynamics of chromosome spreading. *Am. J. Med. Genet.* **61(4),** 387–93.
3. Lowery, M. C. *Application of FISH Technology on Paraffin-Embedded Tissue, Procedural Tips and Trouble-Shooting Guide,* Vysis, Ed. 2000, Downers Grove, IL.
4. Hopman, A. H. N., Poddighe, P., Moesker, O., and Ramaekers, F. C. S. (1991) *Interphase cytogenetics: an approach to the detection of genetic aberration in tumours, in Diagnostic molecular pathology: A practical approach.* (M. J. O. and H. C. S., eds.), IRL Press, New York, NY, pp. 141–167.
5. Jacobson, K., Thompson, A., Browne, G., Shasserre, C., Seelig, S. A., and King, W. (2000) Automation of fluorescence in situ hybridization pretreatment: a comparative study of different sample types. *Mol. Diagn.* **5(3),** 209–220.
6. Ramesh, K. H., Macera, M. J., and Verma, R. S. (1997) Rapid denaturation improves chromosome morphology and permits multiple hybridizations during fluorescence *in situ* hybridization. *Biotech. Histochem.* **72(3),** 141–143.
7. Wetmur, J. G. (1991) DNA probes: applications of the principles of nucleic acid hybridization. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **26(3–4),** 227–259.
8. Britten, R. J., Baron, W. F., Stout, D. B., and Davidson, E. H. (1988) Sources and evolution of human Alu repeated sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85(13),** 4770–4774.
9. Hwu, H. R., Roberts, J. W., Davidson, E. H., and Britten, R. J. (1986) Insertion and/or deletion of many repeated DNA sequences in human and higher ape evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83(11),** 3875–3879.



第二部分　FISH 相关技术及其应用



第 5 章　染色体显微切割

Xin-Yuan Guan

1. 引言

在近几十年中众所周知的是：在大部分人类肿瘤[1]和某些特定人类遗传病[2]中存在染色体重排。肿瘤特定的染色体异常会导致原癌基因产物的激活、肿瘤特异融合蛋白的产生或肿瘤抑制基因的失活。自从染色体显带技术建立以来，肿瘤非随机性染色体异常的细胞遗传学分析已成为许多人类肿瘤诊断和预后不可或缺的指标[3]，但常规显带染色体分析不能确定所有的细胞遗传学染色体重排（如复杂的染色体重排、小环状染色体和不能鉴别的新出现的非平衡性易位）。该技术的局限性阻碍了许多人类肿瘤，尤其是实体瘤核型的确定，但这种情况已被染色体显微切割和 FISH 技术所弥补[4]。染色体显微切割已经成为由细胞遗传学分析快速过渡到分子检测的有力工具。

1.1　染色体显微切割的发展

染色体显微切割最早起源于从一个特定的染色体区域分离出 DNA 标记，并首先成功地应用于果蝇多线染色体[5]和小鼠染色体[6]的研究。在 1989 年，Ludecke 等建立了一个显著提高克隆效率的方法[7]。该方法首先用 *Rsa* I 酶切显微切割的 DNA，连接到一个用 *Sma* I 酶切的 pUC 载体，然后用 PCR 扩增插入位点两侧的载体序列。随后的研究对该方法进行完善，显微切割 DNA 经酶切后连接到一个由 24 碱基或 20 碱基的寡聚核苷酸组成的 5′端突出链接头。用 20 个碱基链接头作为引物进行 PCR 扩增显微切割的 DNA，限制酶酶切扩增产物并克隆到质粒载体中去[8~10]。在这些方法中，通常使用微量注射装置控制的毫微升水平微量移液器进行微量化学操作。然而，这些操作方法的推广应用因切割 20～80拷贝的目标区域需费力、耗时相当长、外源 DNA 污染的高危险性以及微量化学操作的难度而受到限制。

这里将列出一个替代的方法，该方法用简并寡聚核苷酸引物[4,11]直接用 PCR 扩增显微切割 DNA。该方法在显微切割的 DNA 进行 PCR 扩增前增加了拓扑异构酶 I 处理[12]，大大简化了显微切割的程序，与前面所述的一些方法相比有几方面的优势：通过减少显微切割 DNA 的拷贝数降低显微切割的操作时间和难度，同时也降低了外源性 DNA 污染的风险。该操作程序因减少了微量化学操作

而趋于简便、合理化，使得显微切割在细胞遗传学实验室成为常规操作。

1.2 染色体显微切割的应用

尽管染色体显微切割最初用于从特定的染色体区域分离 DNA 标记，但是，一旦该技术与 FISH 技术的联合应用，使得该技术广泛用于细胞遗传学研究和分子克隆操作。经过十余年的发展，显微切割已在下述领域成为非常有用的、重复性好的方法。

1.2.1 感兴趣区域 DNA 克隆的构建

显微切割在人类基因组计划启动之前主要是分离填补物理作图缺口的染色体区域特有的 DNA 标记。定位克隆计划已经建立了几个区域的特异文库，包括 Langer-Giedion 综合征的 8q24[17]、黑素瘤 6q16-q21[13] 和肺泡横纹肌肉瘤的 2q35-q37[14]。另外，应用显微切割获得了 2p16 高度多态性标记物，进而鉴定了遗传性非息肉性直肠癌的 *hMSH2* 基因[15]。

1.2.2 FISH 探针的制备

为了检测以前不可辨认的肿瘤和遗传病的染色体异常，已普遍采用全染色体探针的荧光原位杂交技术。为满足日益增多的高质量染色体涂染探针的需求，染色体显微切割已用于许多 FISH 探针的制备，包括所有人类染色体的涂染探针(WCP)[16]、染色体臂涂染探针（图 1A）[17] 和区带特异性涂染探针（图 1B）[18]。

1.2.3 染色体重排的检测

染色体显微切割最引人注目的特点之一是它可直接检测任何细胞遗传学上可见到的染色体重排的染色体结构。这种独特的方法已用于分析不同的染色体重排，包括缺失、易位、小的环状染色体（图 1C）和扩增。常规显带计为简单末端缺失的畸变，通过用显微切割方法重新分析，结果可清楚地显示该缺失实际上为中间缺失或易位[19~21]。应用显微切割对包括同源染色区域（HSR）和双微小体（图 1D）的基因扩增产物进行分析显示：这些区域通常是由多个染色体区段组成[22,23]。

1.2.4 区域特异性 cDNA 的选择

从 HSR 显微切割 DNA 技术的应用，使得从显微切割区域内分离转录序列的方法得以建立。显微切割结合选择性杂交已用于鉴别骨肉瘤细胞系中 12q13-q15 HSR[24] 和乳腺癌中 20q11-q13.2 HSR 有关的基因[25]。简单地说，显微切割 DNA 的 PCR 产物被固定在尼龙膜上，然后将从癌细胞系中用随机引物法制备的

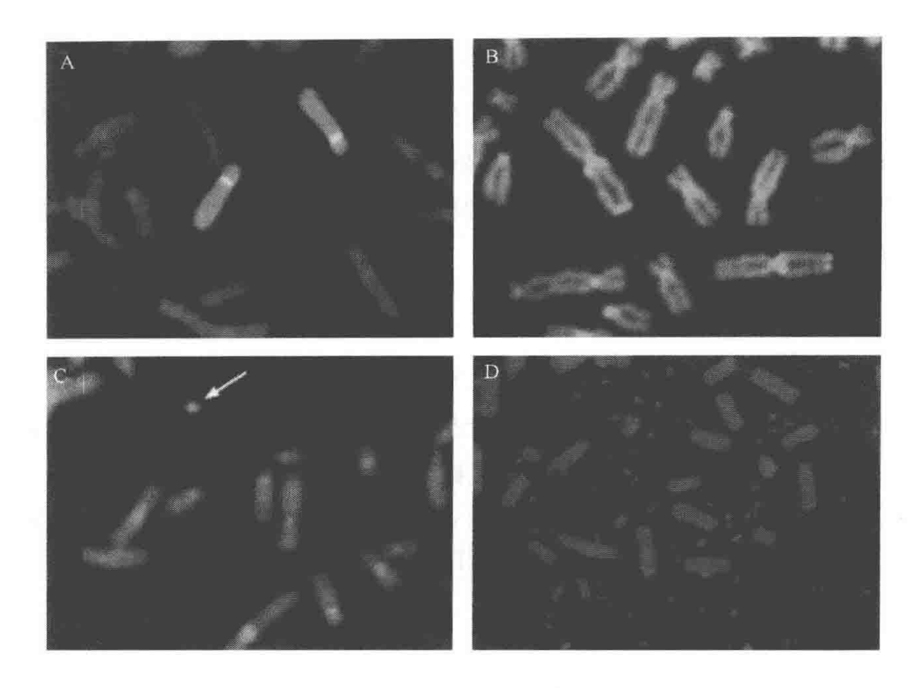


图 1（A）用显微切割制备的 12p（红色）和 12q（绿色）臂特异性涂染探针。（B）用显微切割构建的区带特异性探针的例子：图中所示的是 1p（红色）和 1q（绿色）末端区带的探针。（C）用显微切割确定的一个小环状染色体。切割的 DNA（红色）杂交到小环状染色体（箭头所示）和 14 号染色体的着丝粒。（D）用显微切割确定的双微小体。切割的 DNA（红色）特异性杂交到双微小体（见书后彩图）。

cDNA 与靶 HSR 进行杂交。经杂交和严格洗脱后，特异性杂交的 cDNA 克隆被洗脱并用 PCR 方法回收。

1.3 染色体显微切割策略

这里介绍的染色体显微切割包括两个主要部分：目标染色体区域的显微切割；随后用简并寡核苷酸引物 PCR 扩增切割的 DNA 片段。

1.3.1 染色体显微切割

用于显微切割的中期染色体是用植物血球凝集素（PHA）刺激正常外周血淋巴细胞制备的，中期分裂相滴在干净的盖玻片（22mm×60mm）上并进行 G 显带，通常 3～5 个拷贝的靶染色体区域足以获得高质量探针。染色体显微切割是用安装在倒置显微镜上的显微操作装置控制一个玻璃针来完成的。显微切割的染色体片段转移到 5μL 含拓扑异构酶 I 的收集液中。

1.3.2 用拓扑异构酶I处理切割的DNA

在PCR扩增前，切割的DNA用拓扑异构酶I处理，使得结构非常紧密的DNA螺旋解旋。这种处理可以显著提高被切割DNA序列的回收[12]。收集到期望数量的被切割染色体区段后，显微切割的DNA在37℃条件下用拓扑异构酶I处理1h。

1.3.3 显微切割DNA的扩增

扩增被切割DNA最困难的问题是PCR反应的有效启动。Taq聚合酶对启动PCR不是高效的，因为它的延伸温度是72℃，而且对部分简并引物[26]的最佳退火温度大约是30℃。为了解决这个问题，在PCR第5～8个循环加入T7 DNA聚合酶（测序酶），并且酶是在每个循环的退火温度（30℃）时加入。完成此种预扩增步骤后，接着用Taq聚合酶催化的常规PCR反应完成。

1.3.4 荧光原位杂交（FISH）

FISH是确保显微切割成功并检验探针质量的一种简便快速的方法。被切割DNA经PCR扩增后，用第二轮PCR反应进行荧光标记。标记后的探针经纯化后与正常中期染色体进行杂交。

2. 材料

2.1 用于显微切割的中期染色体的制备

1. RPMI 1640完全培养基：RPMI 1640培养基、15%胎牛血清、1%谷氨酰胺（200mmol/L）和1%青/链霉素（10 000U/mL）。
2. PHA（Murex Biotech Ltd.，Dartford，UK）。
3. 秋水仙胺（10μg/mL）（Gibco-BRL，Gaithersburg，MD）。
4. 低渗液：0.075mol/L KCl。
5. 固定液：甲醇∶冰乙酸=3∶1
6. 22mm×60mm盖玻片。
7. 胰蛋白酶工作液：0.005%胰蛋白酶（Gibco-BRL，Gaithersburg，MD），用不含Ca^{2+}和Mg^{2+}的Hank平衡盐溶液（HBSS）（Gibco-BRL，Gaithersburg，MD）稀释。
8. Giemsa染液：1mL Giemsa原液（BDH Chemicals Ltd.，Poole，UK）加入到50mL 0.01mol/L磷酸钠中（pH 7.0）。

2.2 显微切割和拓扑异构酶 I 处理

1. 玻璃针：用移液管成型器拉制玻璃毛细管（1.2mm 宽和 4in 长，由 WPI，Sarasota，FL 生产）成玻璃针。

2. Kopf 针或移液管成型器：750 型（Kopf，Tujunga，CA）。

3. Stratalinker 2400（Strategene，La Jolla，CA）。

4. 一台倒置显微镜。

5. 一台液压显微操作装置：MO-302 型（Narishige，Japan）。

6. 收集液（终浓度）：4mmol/L Tris-HCl，2mmol/L $MgCl_2$，5mmol/L NaCl，0.2mmol/L dNTP（Pharmacia LKB，Piscataway，NJ），1μmol/L UN1（5′CCG ACT CGA GNN NNN NAT GTG G 3′），1U/50μL 拓扑异构酶 I。

7. PCR 仪和薄壁 PCR 管。

2.3 显微切割 DNA 的扩增

1. 13U/μL 测序酶（Version 2）（US Biochemicals，Cleveland，OH）。

2. 酶稀释缓冲液（US Biochemicals，Cleveland，OH）。

3. PCR 反应混合物（终浓度）：10mmol/L Tris-HCl（pH8.4），2mmol/L $MgCl_2$，50mmol/L KCl，0.2mmol/L dNTP，1μmol/L UN1 引物，2U/50μL AmpliTaq 酶（Perkin Elmer，Norwalk，CT）（见注释 1）。

2.4 荧光原位杂交

1. 生物素-16-dUTP（Roche，Mannheim，Germany）。

2. 3mol/L 乙酸钠（pH 5.2）。

3. TE 缓冲液：10mmol/L Tris-HCl，1mmol/L EDTA。

4. Biospin P6 柱（BioRad，Hercules，CA）。

5. 变性液：70%甲酰胺/2×SSC，溶液储存于 4℃并可反复使用几个月。

6. 杂交缓冲液：70%甲酰胺/2×SSC/10%硫酸葡聚糖。

7. 人 Cot 1-DNA（1mg/mL，Gibco-BRL，Gaithersburg，MD）。

8. 20×SSC：175.3g NaCl，88.2g 枸橼酸钠，pH 7.0 溶于 1L 双蒸水。

9. 洗涤液 I：50%甲酰胺 2×SSC，溶液储存于 4℃并可反复使用几个月。

10. 洗涤液 II：4×SSC，0.1% NP-40（Calbiochemi，La Jolla，CA）。

11. 洗涤液 III：4×SSC。

12. 封闭液：2%（*m*/*V*）BSA 溶于 4×SSC，0.05% Triton X-100 中，储存

于－20℃。

13. 亲和素-FITC和抗亲和素（Vector Laboratories，Burlingame，CA）。

14. PNM缓冲液：95mL 0.1mol/L磷酸钠，0.1mL NP-40，20mg叠氮化钠和5g脱脂奶粉溶于100mL双蒸水。在37℃水浴箱中水浴2h，中间摇动几次直到奶粉完全溶解。将溶液移至室温1d，用台式离心机离心沉淀，取上清液存于4℃备用。

15. 抗淬灭溶液：100mg *p*-二氢氯化苯二胺溶于10mL PBS，调节pH至8.0，并加90mL甘油，用0.22μm滤器过滤去除未溶解颗粒，储存于－20℃。

16. 4′,6-二氨基-2-苯基吲哚（DAPI）。

3. 方法

3.1 显微切割中期染色体的制备

1. 取0.5mL外周血与含PHA的4.5mL RPMI 1640培养液混合，在37℃培养细胞64～68h。

2. 收获细胞前20min在培养基中加入25μL秋水仙胺（10μg/mL），继续在37℃培养。

3. 将细胞培养物移至15mL离心管中250*g*离心5min，然后小心弃上清。

4. 用10mL低渗液重悬细胞沉淀，37℃水浴中温育12～18min，250*g*离心5min，弃上清。

5. 用8mL新鲜配制的Carnoy固定液轻柔地重悬细胞，将试管放置冰中至少2h，250*g*离心5min，然后小心弃上清。

6. 用5mL固定液洗细胞2次，250*g*离心5min。

7. 用0.5～1.5mL固定液重悬细胞，获得有点不透明的悬液用于滴片（见注释2）。

8. 滴2或3滴细胞悬液在干净的呈45°角倾斜的盖玻片上，随液体的流动铺匀整张片子，不要吹片子避免污染。

9. 将片子在37℃无菌容器中可放置3～5d备用（见注释3）。

10. 在显微切割前完成用胰蛋白酶-Giemsa处理的标准G带。用胰蛋白酶工作液在室温中处理1～2min，将片子移至室温条件下的Giemsa工作液5min，然后用蒸馏水漂洗片子，气干。

3.2 显微切割和拓扑异构酶I处理

1. 在倒置显微镜下找到靶染色体，该显微镜有可随意转动的载物台，以使

靶染色体垂直于玻璃针的移动轴。如果可能，显微镜应放在防震的台面上以减少振动。

2. 用固定在显微镜上的显微操作装置控制的玻璃针切割靶染色体区域（见注释 4）。

3. 将玻璃针的针尖放置在靶 DNA 片段的正上方，然后向下移动玻璃针轻轻触及该片段。利用静电的力量将 DNA 片段吸到针尖，然后移动针尖到 5μL 收集液中。

4. 在收集到预期数量（5 拷贝）的切割 DNA 片段后，滴一滴矿物油覆盖在收集液上。在显微切割的 DNA 扩增前，用拓扑异构酶 I 37℃处理 1h 使结构非常紧密的 DNA 解旋。

3.3 扩增切割的 DNA

1. 进行 PCR 启动程序（5～8 个循环，94℃、1min，30℃、2min，37℃、2min），在每个循环的 30℃时加入约 0.3U 的测序酶（13U/mL 的测序酶用酶稀释缓冲液稀释 1～8 倍，在 5μL 的反应体系中加入 0.2μL 测序酶稀释液）。

2. 完成上述预扩增步骤后，在同一 PCR 管中进行 Taq 酶参与的常规 PCR 反应，PCR 体系为 50μL，PCR 反应条件：94℃、1min，56℃、1min，72℃、1.5min 的 30 循环，最后在 72℃延伸 5min。

3. 加 2μL 第一轮 PCR 产物到另一个 50μL PCR 反应体系中，进行 20 个 PCR 循环，反应条件同步骤 2。

4. 可用电泳分析识别处理的是否成功，将 5μL PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶上电泳。PCR 产物的大小范围应在 200～800bp。

3.4 荧光原位杂交

1. 制备 FISH 探针，加 2μL 第二轮的 PCR 产物到与上述步骤相同的 50μL PCR 反应体系（除了加入终浓度为 20μmol/L 生物素-16-dUTP 外）中，继续 PCR 反应 20 个循环：94℃、1min，56℃、1min，72℃、2min，最后在 72℃延伸 5min。

2. 按照产品说明的步骤用 Bio-gel P6 过滤柱上离心 PCR 产物，以去除未掺入生物素-16-dUTP。

3. 用 1/10 体积 3mol/L 乙酸钠和 2 倍体积乙醇在 4℃沉淀探针 20min。4℃条件下用 10 000*g* 离心 15min，用 40μL TE 缓冲液重悬探针。

4. FISH 探针杂交是基于以前介绍的操作步骤基础上[12]。简言之，对于每个杂交反应，大约 100ng 标记的探针混合于 10μL 杂交缓冲液（7μL 杂交混合

液、2μL 探针和 1μL 人 Cot 1-DNA）中，在 75℃变性 5min，接着在 37℃预杂交 20min。

5. 中期染色体标本需在 72℃变性液中变性 2min，然后将标本用 70%、85% 和 100%的乙醇系列脱水。

6. 将含有探针的杂交缓冲液滴在变性后的片子上，盖上 22mm×22mm 盖玻片，用橡皮胶封片。移至 37℃湿盒中杂交过夜。

7. 杂交完成后，移去盖玻片，将片子用 45℃ 洗液 I 洗 3 次，每次 5～10min。

8. 室温下用洗涤液 II 洗 3 次，用洗涤液 III 洗 1 次，每次 2min。

9. 只含有直接标记探针的杂交可在此时进行分析。用生物素标记探针的杂交，用 40μL 含 5μg/mL FITC-亲和素的 PNM 缓冲液室温处理 20min。然后按步骤 8 洗涤标本。

10. 染色体标本经 40μL 含 5μg/mL 抗亲和素抗体的 PNM 缓冲液室温处理 20min，将荧光信号放大；然后按步骤 8 洗涤标本。

11. 染色体标本通常用另一层的 FITC-亲和素处理，处理条件同步骤 9。

12. 染色体标本经过 70%、85%和 100%乙醇系列脱水，空气中干燥。用 40μL 含 DAPI（1μg/mL）的抗淬灭剂液复染，盖上盖玻片，用装有合适滤光片的荧光显微镜进行观察。

4. 注释

1. 为了减少污染带来的影响，所有装试剂的玻璃器皿都要清洗并在用前高压灭菌 2 次。高纯度的水用 0.22μm 滤器过滤后再用高压灭菌 2 次，40min。同样，盐溶液也需要用高纯度的试剂来配制，按照水过滤和高压灭菌的方式进行准备。

2. 用 Carnoy 固定液固定细胞（甲醇：冰乙酸＝3：1）；用固定液保存 1 年内的细胞可获得高质量的 FISH 探针。

3. 用于显微切割的中期染色体标本片龄最好为 3～14d；标本暴露于高温环境（≥60℃）或存放时间过长可降低切割产物的质量。

4. 玻璃针是用一个自动化的、弹簧负载的移液管成型器制备。针尖断点的直径与染色体的宽度一致，针要放在无菌的培养皿中保存，每次使用前要用紫外灯照射 5min，确保消除 DNA 污染。

5. DNA 污染是扩增切割的 DNA 的关键问题，由于最初切割的 DNA 量非常小（10^{-13}～10^{-14} g/片段），即使很小量的 DNA 污染也可淹没切割的 DNA 而产生无用的 PCR 扩增产物。污染的 DNA 可由玻璃针接触其他 DNA 而来，也可当反复开关试管盖时来自空气中，甚至来自切割前试剂中外源 DNA 的污染。因

此，所有用于显微切割的试剂在使用前都应检测有无污染。检测用0.1ng人类全基因组DNA或无DNA进行普通PCR反应，经过40个循环：94℃、1min，56℃、1min，72℃、2min，进行PCR的试剂纯度可用电泳分析来检验。当阳性对照产物为200～800bp时，阴性对照产物很少或无可见产物，这些试剂对于显微切割是适合的；否则对体系中每一个试剂都进行替换直到得到阴性空白。当所有PCR反应试剂都证实是适合显微切割后，还应检测拓扑异构酶和测序酶。

（刘青杰 译，陈德清 校）

参考文献

1. Miteiman, F., Kaneko, Y., and Trent, J. (1991) Human gene mapping 11: Report of the committee on chromosome changes in neoplasia. *Cytogenet. Cell Genet.* **58,** 1053–1079.
2. Frezal, J. and Schinzel, A. (1991) Human gene mapping 11: Report of the committee on clinical disorders, chromosome aberrations and uniparental disomy. *Cytogenet. Cell Genet.* **58,** 986–1052.
3. Sandberg, A. (1990) *The Chromosomes in Human Cancer and Leukemia.* Elsevier Press, New York.
4. Meltzer, P. S., Guan, X.-Y., Burgess, A., and Trent, J. M. (1992) Rapid generation of region specific probes by chromosome microdissection and their application. *Nat. Genet.* **1,** 24–28.
5. Sclaenghe, F., Turco, K. E., Edstrom, J-E., Pirrotta, V., and Melli, M. (1981) Microdissection and cloning of DNA from a specific region of Drosophila melanogaster polytene chromosomes. *Chromosoma* **82,** 205–216.
6. Rohme, D., Fox, H., Herrmann, B., et al. (1986) Molecular clones of the mouse t complex derived from microdissected metaphase chromosomes. *Cell* **36,** 783–788.
7. Lüdecke, H.-J., Senger, G., Claussen, U., and Horsthemke B. (1989) Cloning defined regions of the human genome by microdissection of banded chromosomes and enzymatic amplification. *Nature* **338,** 348–350.
8. Saunders, R. D., Glover, D. M., Ashburner, M., et al. (1989) PCR amplification of DNA microdissected from a single polytene chromosome band: A comparison with conventional microcloning. *Nucl. Acids Res.* **17,** 9027–9037.
9. Johnson, D. H. (1990) Molecular cloning of DNA from specific chromosomal regions by microdissection and sequence-independent amplification of DNA. *Genomics* **6,** 243–251.
10. Kao, F-T. and Yu, J-W. (1991) Chromosome microdissection and cloning in human genome and genetic disease analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88,** 1844–1848.
11. Wesley, C. S., Ben, M., Kreitman, M., Hagag, N., and Eanes, W. F. (1990) Cloning regions of the Drosophila genome by microdissection of polytene chromosome DNA and PCR with nonspecific primer. *Nucl. Acids Res.* **18,** 599–603.
12. Guan, X.-Y., Trent, J. M., and Meltzer, P. S. (1993) Generation of band-specific painting probes from a single microdissected chromosome. *Human Molecular Genet.* **2,** 1117–1121.
13. Guan, X.-Y., Meltzer, P. S., Cao, J., and Trent, J. M. (1992) Rapid generation of region-specific genomic clones by chromosome microdissection: Isolation of DNA from a region frequently deleted in malignant melanoma. *Genomics* **14,** 680–684.
14. Yu, J., Tong, S., Yang-Feng, T., and Kao, F.-T. (1992) Construction and characterization of a region-specific microdissection library from human chromosome 2q35–q37.

Genomics **14,** 769–774.
15. Leach, F. S., Nicolaides, N. C., Papadopoulos, N., et al. (1993) Mutations of a *mutS* Homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* **75,** 1215–1225.
16. Guan, X.-Y., Meltzer, P. S., and Trent, J. M. (1994) Rapid construction of whole chromosome painting probes by chromosome microdissection. *Genomics* **22,** 101–107.
17. Guan, X.-Y., Zhang, H. E., Bitter, M., Jiang, Y., Meltzer, P. S., and Trent, J. M. (1996) Chromosome arm painting probes. *Nat. Genet.* **12,** 10–11.
18. Guan, X.-Y., Meltzer, P. S., Burgess, A., and Trent, J. M. (1995) Complete coverage of chromosome 6 by microdissection probes. *Human Genet.* **95,** 637–640.
19. Meltzer, P. S., Guan, X.-Y., and Trent, J. M. (1993) Telomere capture stabilizes chromosome breakage. *Nat. Genet.* **4,** 252–255.
20. Guan, X.-Y., Horsman, D., Zhang, H., Meltzer, P. S., and Trent, J. M. (1996) Mapping a recurrent breakpoint on chromosome 6q11 in human follicular lymphoma by chromosome microdissection. *Blood* **88,** 1418–1422.
21. Weimer, J., Kiechle, M., and Arnold, N. (2000) FISH-microdissection (FISH-MD) analysis of complex chromosome rearrangements. *Cytogenet. Cell Genet.* **88,** 114–118.
22. Guan, X.-Y., Meltzer, P. S., Dalton, W. S., and Trent, J. M. (1994) Identification of cryptic sites of DNA sequence amplification in human breast cancer by chromosome microdissection. *Nat. Genet.* **8,** 155–161.
23. Van Den Berg, C., Guan, X.-Y., Von Hoff, D., et al. (1995) DNA sequence amplification in human prostate cancer identified by chromosome microdissection: Potential prognostic implications. *Clin. Cancer Res.* **1,** 11–18.
24. Su, Y. A., Meltzer, P. S., Guan, X.-Y., and Trent, J. M. (1994) Direct isolation of expressed sequences encoded within a homogeneous staining region by chromosome microdissection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91,** 9121–9125.
25. Guan, X.-Y., Xu, J., Anzick, S. L., Zhang, H. E., Trent, J. M., and Meltzer, P. S. (1996) Direct selection of transcribed sequences from microdissected DNA: Isolation of genes within a commonly amplified region at 20q11–q13.2 in breast cancer. *Cancer Res.* **56,** 3446–3450.
26. Telenius, H., Pelmear, A. H., Tunnacliffe, A., et al. (1992) Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. *Genes Chromsom. Cancer* **4,** 257–263.
27. Zhang, J., Meltzer, P., Jenkins, R., Guan, X.-Y., and Trent, J. (1993) Application of chromosome microdissection probes for elucidation of BCR-ABL fusion and variant Philadelphia chromosome translocations in chronic myelogenous leukemia. *Blood* **81,** 3365–3371.

第 6 章 引物介导的原位标记技术

Jorn Koch

1. 引言

引物介导的原位标记技术（primed *in situ* labeling，PRINS）是一种对细胞及组织的特异 DNA 序列染色的杂交技术，它能够得到和 FISH 技术相同类型的结果。它和 FISH 技术不同之处在于染色途径，PRINS 技术中所使用的探针是未标记的，染色结果是在探针结合点原位合成的标记 DNA。为获得这种位点特异的 DNA 序列，探针应在引物依赖的 DNA 聚合酶（这种聚合酶可以从引物的 3′端合成 DNA）存在的条件下杂交，并且在 DNA 合成时将标记的核苷酸作为底物。PRINS 技术的主要优点是利用穿透性强的探针（见注释 1）快速、经济地检测目标序列。探针可由任一寡聚核苷酸合成公司合成，并可根据不同的实验目的进行设计。与一般的 FISH 技术相比，其缺点是对标本质量和恒温箱要求更高(见注释 2～4)、很少有市售的理想探针以及不能同时检测多个单拷贝目标。国际上已经有一个专门的 PRINS 工作小组，他们的网址是 www.icg-prins.org，已经测试过的引物序列会在网站上公布。然而由于 PRINS 技术缺乏商业利益，很难通过政府部门许可，这就限制了该技术在世界上某些国家的诊断应用。

1.1 PRINS 技术的应用

1.1.1 灵敏、高分辨率地检测串联重复 DNA 序列

该技术最初设计就是用来鉴别紧密相连的串联重复序列[1]，目前用寡核苷酸探针检测染色体及核（原位）中的串联重复序列仍是该技术的主要用途[2]。利用这一简单快捷的技术，可以有效地检测出很短的串联重复序列及单个核苷酸区别的序列[3,4]。近来该技术又进一步发展为双脱氧 PRINS（ddPRINS）技术。在 ddPRINS 技术中，使用缺失一个或多个核苷酸的特定重复序列进一步提高了 PRINS 的分辨率及信噪比。将缺少的核苷酸用双脱氧核苷酸类似物代替能有效的进行 DNA 合成，但是 DNA 的非特异合成被阻断，这是 ddPRINS 技术的基础所在。例如，端粒重复序列包含一条富含 G 而缺少胞嘧啶 C 的链，和其互补的富含 C 的链则缺少鸟嘌呤 G。因此，富含 G 的链可由含 ddCTP 的 ddPRINS 合成，富含 C 的链则由含 ddGTP 的 ddPRINS 合成。相对于标准的 PRINS 而言，ddPRINS 将端粒染色的信噪比提高了大约一个数量级，将效率提高到了 100%，

并将目标 DNA 检测的阈值降低到几百个碱基（相当于每个靶位点 2～3 个引物反应）[5~8]。此外，因为目标 DNA 的一条链的 5′端被一个引物结合，另一条链 5′端被另一个引物结合，这也使得检测目标 DNA 的定向成为可能。用该技术通过相互比较可以确定不同端粒重复之间的相对位置关系。

1.1.2 定量检测 DNA 序列（Q-PRINS）

PRINS 设计了能够很好穿透标本的高浓度短探针，目标 DNA 可以有效的被饱和，因此可以进行定量反应。基于 ddPRINS 反应[5]，也就有了可以用来测量单个染色体末端端粒重复区域长度的可能性。类似的方法也可以用来测定其他长度不同的简单重复区域的大小，如三核苷酸重复序列。Q-PRINS 反应可以用两种方法来评估，第一种是只计算染色率（100 个潜在目标中有多少个真正被染色）。染色率越高，目标 DNA 越大[9]。对于 ddPRINS 计算染色率就不实用，因

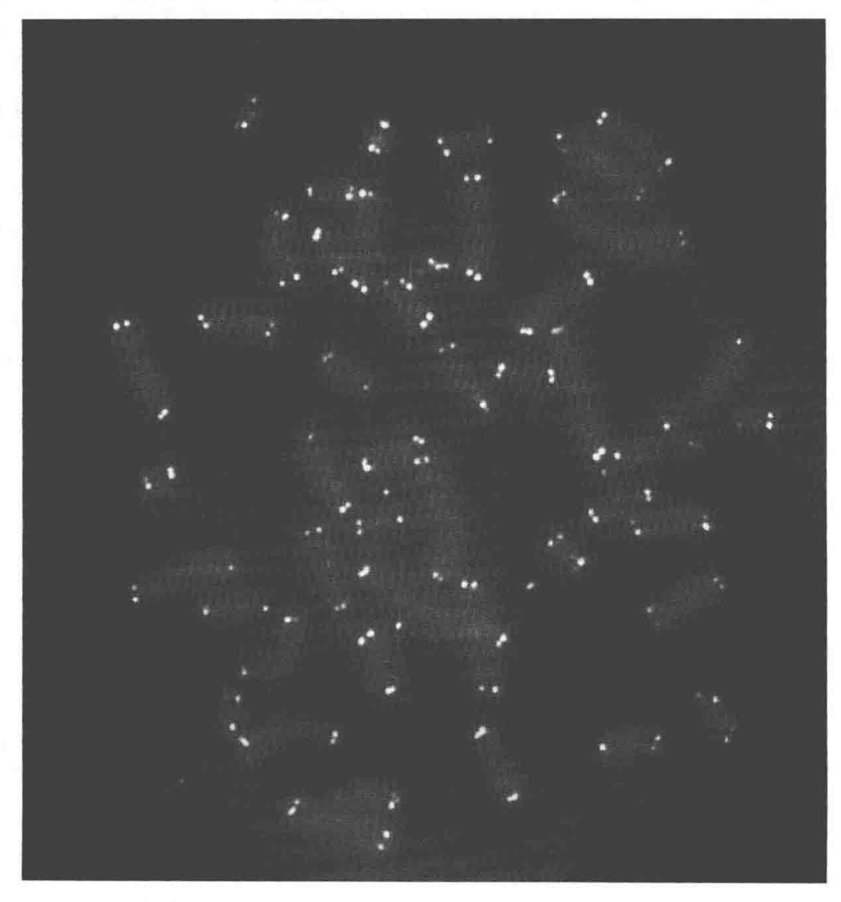


图 1　人染色体中期分裂相的 ddPRINS 结果。每个染色体由两条染色单体组成，每条染色单体有两个端粒，因此每个细胞目标/信号的数目为 184。然而，相邻染色单体的信号可能出现融合。主要由于来自染色质的自发荧光，染色体的轮廓肉眼也可见。

为在许多情况下染色率都接近100%。正常人血淋巴细胞中，主要端粒重复序列的平均染色率为99.8%（图1）。在这种情况下，则最好检测PRINS的信号强度。我们已经建立了该方法的操作程序，使用以前的VYSIS图像分析程序QUIPS进行分析[5]。另外一个可以使用的分析程序来自DAKO，该程序似乎同样适用于信号定量。延伸的三核苷酸重复一般染色效率低，是以通过确定细胞标记百分率来衡量其相对长度。

1.1.3 检测单拷贝的目标序列

检测单拷贝目标序列传统上被认为是PRINS技术的弱点所在。然而最近报道如果使用多重引物，并使用酪胺信号放大系统增强信号，可以高灵敏度地检测单拷贝序列[10,11]。除了这两点改动之外，单拷贝目标序列检测程序与前面的PRINS操作流程相同。

1.1.4 自身引物介导的原位标记（SPRINS）

如果没有外加引物，则可检测内源性引物位点（自身标记）的引物介导的原

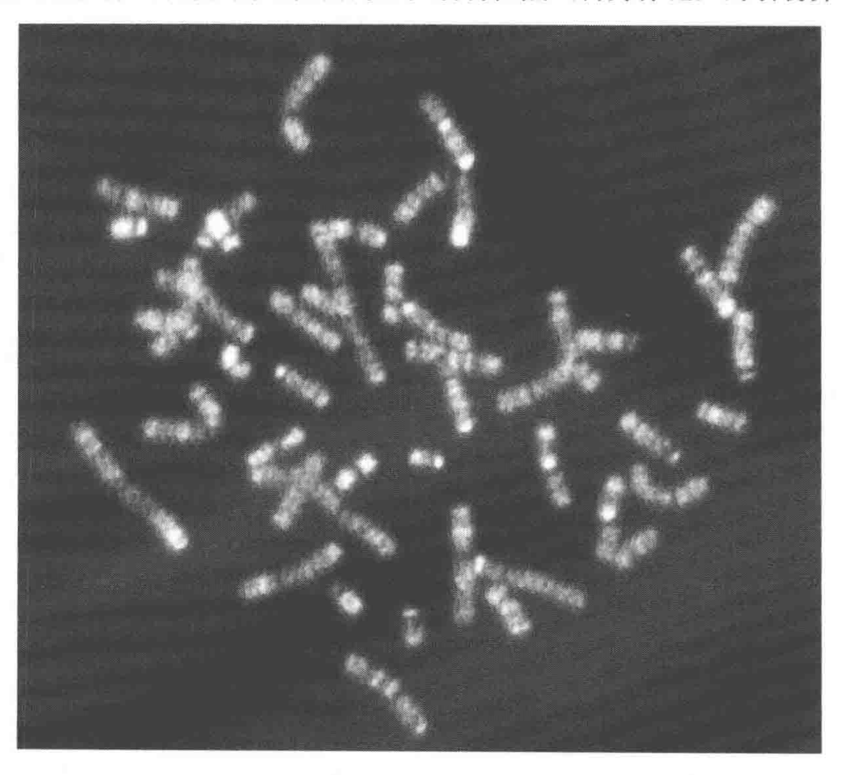


图2 用限制性内切核酸酶 *Msp* I 消化的人类染色体中期分裂相的SPRINS结果。染色体上呈现染色体特异性带型。

位标记。在正常分裂相中有非常低的背景（在 ddPRINS 没有）。在分散不良的中期分裂相中，背景染色会明显增强（见注释 2）。然而，值得注意的是该现象可以应用于 DNA 修饰酶的体内和体外活性的研究。用核酶或限制性内切核酸酶消化染色体分裂相，产生的缺口密度（也是酶活性位点）可以用 SPRINS 技术来显示（图 2）。同样，如果生物体内 DNA 的缺口是由于细胞程序化的结果，可以用 SPRINS 技术检测该缺口以反映细胞的状态（如检测凋亡或拓扑异构酶活性）[12]。

1.1.5 组合标记

在同时检测多个目标时，PRINS 可以和 PRINS、FISH 或免疫染色组合使用[13~15]。在 FISH 反应前进行 PRINS 反应经常可以省去其他一些必要的预处理（如蛋白酶处理）。PRINS 技术与 FISH 技术相比，对标本质量的破坏性要小，并对前面的免疫染色反应质量的破坏性也要小。这样，如果抗体已经通过多聚甲醛固定而被保护，抗体染色就不会因为后面的 PRINS 反应而减弱太多。

2. 材料

1. 中期染色体分裂相（见注释 3）。
2. 盖玻片。
3. 用于洗玻片的染色缸或其他合适的容器。
4. 标准的三磷酸核苷，及用于 ddPRINS 的双脱氧核苷（Lithium salt，Roche）。半抗原或荧光素标记的核苷（地高辛-dUTP、生物素-dUTP、荧光素-dUTP、罗丹明-dUTP [Roche]）。
5. Tth 或 Taq DNA 聚合酶及 10×聚合酶缓冲液（酶及缓冲液都由 Roche 公司提供）。
6. 5mol/L NaCl。
7. 500mmol/L EDTA。
8. 20×SSC。
9. 20% Tween-20。
10. 冰冷（－20℃）梯度乙醇系列 [70%、90%、99%（*V*/*V*）] 用于 PRINS 预变性标本。
11. 脱脂奶粉（粉末）。
12. 荧光标记的抗地高辛抗体（Fab 片段，Roche）用于检测地高辛标记的 PRINS 产物。荧光标记的链霉亲和素用于检测生物素标记的 PRINS 产物（Roche，Vector Laboratories）。
13. 抗淬灭剂溶液：Vectashield（Vector 实验室）或 *p*-二氢氯化苯二胺

(Sigma)。

14. 复染剂：PI（Sigma）或 DAPI（Sigma）。

15. 用于基本 PRINS 的 10×dNTP（50%甘油中含 dATP、dCTP、ddGTP 各 1.0mmol/L，标记的 dUTP 0.1mmol/L 的混合物）。在－20℃可以保存至少一年。甘油可以防止液体在－20℃冻结，因此在取部分液体时不存在反复冻融的问题。

16. 用于双脱氧-PRINS（含 ddGTP）的 10×dNTP（50%甘油中含 dATP、dCTP、dGTP 各 1.0mmol/L，标记的 dUTP 0.1mmol/L 的混合物）。在－20℃可以保存一年。

17. 反应混合物（基本 PRINS 用 50μL 体系）：38μL ddH_2O、5μL 10×聚合酶缓冲液、5μL 10×dNTP、1μL DNA 探针（500ng 以上）、1μL DNA 聚合酶（1U），轻弹 Eppendorf 管混匀，加入聚合酶后立即使用。未加聚合酶的混合物可以在－20℃保存数月。

18. 反应终止液：50mmol/L NaCl，50mmol/L EDTA，pH 8.0。

19. 洗脱液：4×SSC，pH 7.0（1×SSC：150mmol/L NaCl，15mmol/L 柠檬酸钠），0.05% Tween-20。

20. 封闭液：5%（*m*/*V*）脱脂奶粉（溶解在洗脱液中。Eppendorf 离心机离心 2min 取上清使用）可以在－20℃保存数年。在使用的时候最好将封闭液在－20℃保存，超过一个星期就不能再使用（因为时间长了，牛奶会变酸）。

21. 两种恒温装置（电热恒温块或水浴箱），标本应放置在金属表面以保证良好的热传导，其中一个表面温度为 94℃，另外一个为 55～65℃。94℃的恒温装置的温度应仔细测量，应保持在期望值 1～2℃之内。用一个绝缘的盖子盖在玻片上或电热恒温板上可能对控制温度有所帮助（见注释 3），或用一个特殊的 PRINS/原位 PCR 的仪器（Hybaid，MJ-Research 或 Techne）预置在 91～94℃孵育标本 2～4min 及 55～65℃孵育 5～60min（根据所用的寡核苷酸确定）。在该实验中把变性温度轻微的调低一些，原因是这样可以补偿电热恒温板和标本（在金属表面并盖一个盖子）内部之间 1.5℃的温度差（见注释 4）。

3. 方法

3.1 标准一步反应

PRINS 技术的操作规程有两套，一套和 FISH 技术一样，将样本在热甲酰胺中变性，然后按 3.4 立即在系列梯度冰冷乙醇中淬火。或按下面的叙述通过将标本和反应混合物共同加热到变性温度将样本变性：

1. 确定玻片有多大区域需要分析，选择适合该区域的盖玻片和一定数量的

反应混合物。每毫米长度的盖玻片用 1μL 的反应混合物。准备 60μL 反应混合物完全覆盖标准的玻片，并盖上 24mm×60mm 的盖玻片。对于较小的区域就要用较少量的反应混合物和较小的盖玻片。

2. 当反应混合物随着盖玻片展开的时候，将做好的标本放在有盖子的电热恒温板上 94℃、4min 变性（见注释 4）。

3. 将标本迅速转移到 55～65℃孵育 5～60min，用于探针退火及链延伸。简单重复序列的探针退火快，探针越复杂退火越慢，链的延伸实际上是瞬间完成的，因此退火时间决定孵育的时间。

4. 将标本放到预热到 55～65℃反应终止液中 1min，终止 PRINS 反应。

5. 将标本转移至 50mL 的洗脱液中，室温洗脱大约 3min（实验可以在这一步暂停，可以将标本在洗脱液中 4℃放置过夜）。

6a. 如果使用了荧光素标记核苷酸，现在就可以将标本复染、封片并在显微镜下计数分析。

6b. 如果使用了地高辛标记核苷酸，需要按 3.6 将其用抗地高辛的抗体显色。

3.2 ddPRINS

将 PRINS 过程中，在正确杂交探针进行 DNA 合成时所不需的核苷酸种类替换为相应的双脱氧核苷酸即可（如当合成人端粒元件 CCCTAA 时用 ddGTP 替换 dGTP）。

3.3 组合标记

组合标记有两个主要的不同策略，先进行 PRINS 反应或后进行 PRINS 反应。在 PRINS-FISH 中，PRINS 要先进行，这样可以避免 FISH 探针参与 PRINS 反应，FISH 探针应在标本已用冰冷乙醇淬火后再加入。避免标本在 PRINS 检测后再变性非常重要，因为标本变性会导致 PRINS 信号消失。而在 PRINS-免疫染色中，PRINS 应后进行。免疫染色后将标本在 2%多聚甲醛中室温固定 2min，并在 PRINS 操作前用系列乙醇梯度（70%、90%和 99%）脱水以提高免疫染色的存在。

3.4 已变性样本上的 PRINS

如果只能使用甲酰胺变性的标本，如恒温装置不足以提供加热变性的温度，标本在 70%甲酰胺中 70℃变性 2min，或参考所在实验室 FISH 技术变性的标准

程序进行变性。如果前面已经进行了 PRINS 的操作，标本可能已经处于变性状态。在这些情况下，将标本立即放入－20℃系列乙醇梯度中淬火以使目标 DNA 保持变性结构状态非常重要。

1. 变性后应尽可能快的将标本放入－20℃系列梯度乙醇（70%、90%和99%）中脱水各 3min。

2. 将标本从 99%乙醇中移出，沥尽液体。

3. 在上述步骤操作过程中准备反应混合物。如果该反应是第二个 PRINS 反应，确保这次使用的是不同标记的 dNTP。

4. 退火及链延伸：将样本在 55～65℃预热 1min。然后将同样预热的反应混合物加在标本上并随着盖玻片蔓延开。

5. 和前面的操作一样进行孵育、终止和洗脱。这时的标本就已经准备好，可以进行抗体染色及复染/封片。

6. 如果需要进行第三次 PRINS 反应，重复步骤 1～5。

3.5 自身引物介导的原位标记（SPRINS）

SPRINS 可以按照上面步骤 2～5 进行操作（标本在任何一步不能进行变性操作，因此不需要第 1 步）。

3.6 直观地高辛或生物素标记的 PRINS 产物

1. 将含荧光素结合的抗地高辛抗体（或链霉亲和素 2ng/μL）的 50μL 封闭液加到标本上。盖上盖玻片避光孵育 30～60min。

2. 用 50mL 的洗脱液洗脱 2 次，每次 5min。这时的标本已经可以进行复染和封片。

3.7 复染及封片

1. 用含 0.4μmol/L DAPI 的抗淬灭剂溶液可以获得蓝色复染的 DNA。

2. 用含 PI 的抗淬灭剂溶液可以获得红色复染的 DNA，用 20μL 含 0.5μg/mL PI 的抗淬灭剂溶液将标本封片。

4. 注释

1. PRINS 技术的优点是探针非常短小，易于穿透组织并接近目标，即使标本具有紧密的结构。Franck Pellestor 的研究小组用该技术对精子细胞内的目标

序列进行了有效的染色[16]。

2. PRINS 技术偶尔会出现的问题是卫星 DNA 特定区域的“自标记”。在人类染色体中，9 号染色体的卫星 DNA III 自标记出现更少一些，染色体 1 和 16 上的卫星 DNA II 则可能出现此种情况。这种自标记现象有一定程度的引物依赖性，但在任何引物的存在下都可能出现。有些引物总是会引起自标记，但对大多数引物来说只在质量差的分裂相中可以看到，因此解决该问题的办法就是制备高质量的分裂相。

3. PRINS 技术非常依赖于目标序列的完整性。有缺口或断裂的 DNA 不仅是原位链延伸非常差的模板，而且通过染色体 DNA 缺口原位内部链延伸也会导致伴随 PRINS 染色而出现的低背景染色。在标准分裂相中进行 PRINS 操作时，达到目标一般不是问题，因此新鲜制备标本是获得最佳反应的良好开端。如果不能获得最佳的标本，可以用蛋白酶（不含 DNA 酶）处理提高通透性、用多聚甲醛固定提高脆弱染色质的稳定性、用 DNA 连接酶修复断裂的 DNA。在旧标本中的染色质可能已经变硬，因此在热变性需要长时间的孵育，如室温放置一个月的旧标本变性 10min。

4. 如果使用热变性标本，应严格控制温度保证在目标序列变性的同时不破坏聚合酶的活性。一些公司可以提供计算机控制的恒温箱（我们使用的恒温箱是由 Hybaid 和 MJ-Rearch 公司提供）。如果没有专门的恒温箱，可以使用稳定的水浴锅或电热恒温板。任何这样的装备装配一个绝缘的盖子以保证准确的孵育温度非常重要。

（赵宝锋 译，刘青杰 校）

参考文献

1. Koch, J., Kølvraa, S., Gregersen, N., and Bolund, L. (1989) Oligonucleotide-priming methods for the chromosome-specific labeling of alpha satellite DNA *in situ*. *Chromosoma* **98,** 259–265.
2. Koch, J., Hindkjær, J., Kølvraa, S., and Bolund, L. (1995) Construction of a panel of chromosome specific oligonucleotide probes (PRINS-primers) useful for the identification of individual human chromosomes *in situ*. *Cytogenet. Cell Genet.* **71,** 142–147.
3. Pellestor, F., Girardet, A., Andréo, B., and Charlieu, J. P. (1994) A polymorphic alpha satellite sequence specific for human chromosome 13 detected by oligonucleotide primed *in situ* labeling (PRINS). *Hum. Genet.* **94,** 346–348.
4. Pellestor, F., Girardet, A., Lefort, G., Andréo, B., and Charlieu, J. P. (1995) Rapid *in situ* detection of chromosome 21 by PRINS technique. *Am. J. Med. Genet.* **56,** 1–8.
5. Krejci, K. and Koch, J. (1998) Improved detection and comparative sizing of human chromosomal telomeres *in situ*. *Chromosoma* **107,** 198–203.
6. Krejci, K. and Koch, J. (1999) An *in situ* study of variant telomeric repeats. *Genomics* **58,** 202–206.
7. Serakinci, N. and Koch, J. (1999) Detection and sizing of human telomeric repeat DNA *in situ*. *Nature Biotech.* **17,** 200–201.

8. Serakinci, N. Krejci, K., and Koch, J. (1999) Telomeric repeat organization—a comparative *in situ* study between man and rodent. *Cytogenet. Cell Genet.* **86,** 204–211.
9. Therkelsen, A. J., Nielsen, A., Koch, J., Hindkjær, J., and Kølvraa, S. (1995) Staining of Human telomeres with primed *in situ* labeling (PRINS). *Cytogenet. Cell Genet.* **68,** 115–118.
10. Kadandale, J. S., Tunca, Y., and Tharapel, A. T. (2000) Chromosomal localization of single copy genes *SRY* and *SOX3* by primed *in situ* labeling (PRINS). *Microbial and Comparative Genomes* **5,** 71–74.
11. Kadandale, J. S., Wachtel, S. S., Tunca, Y., Wilroy Jr., R. S., Martens, P. R., and Tharapel, A. T. (2000) Localization of SRY by primed *in situ* labeling in XX and XY sex reversal. *Am. J. Med. Genet.* **95,** 71–74.
12. Andersen, C., Koch, J., and Kjeldsen, E. (1998) CpG islands detected by self primed in situ labeling (SPRINS). *Chromosoma* **107,** 260–266.
13. Mitchell, A., Jeppesen, P., Hanratty, D., and Gosden J. (1992) The organization of repetitive DNA sequences on human chromosomes with respect to the kinetochore analysed using a combination of oligonucleotide primers and CREST anticentromere serum. *Chromosoma* **101,** 333–341.
14. Hindkjær, J., Koch, J., Terkelsen, C., Brandt, C. A., Kølvraa, S., and Bolund, L. (1994) Fast and sensitive multicolor detection of nucleic acids *in situ* by PRimed IN Situ labeling (PRINS). *Cytogenet. Cell Genet.* **66,** 152–154.
15. Hindkjær, J., Brandt, C. A., Koch, J., Lund, T. B., Kølvraa, S., and Bolund, L. (1995) Simultaneous detection of centromere specific probes and chromosome painting libraries by a combination of Primed *in situ* labeling and chromosome painting (PRINS-painting). *Chromosome Res.* **3,** 41–44.
16. Pellestor, F., Girardet, A., Andréo, B., Lefort, G., and Charlieu, J. P. (1997) Incidence of chromosome 1 disomy in human sperm estimated by the primed *in situ* (PRINS) labeling technique. *Cytogenet. Cell Genet.* **76,** 192–195.

第 7 章　光谱染色体核型分析

Jane Bayani, Jeremy A. Squire

1. 引言

在临床细胞遗传学历史上，G 显带作为“金标准”用于检测临床样本的总染色体异常，从简单的数量改变到识别复杂的结构重排。“标记染色体”或“衍生染色体”指的是那些 G 带不能鉴定和识别的异常。这通常是因为重排的复杂性造成缺乏连续的可识别的带型。各种多色荧光原位杂交（FISH）的染色体涂染技术[1,2]的出现能够识别所有的标记染色体，但应用这些技术快速鉴定复杂染色体重排的目标仍然需要精心的设计来达到。

光谱染色体核型分析（SKY）采用 24 种颜色对所有染色体进行涂染，在一次试验中可以观察到每一条染色体。该技术以光谱成像[3]和傅里叶光谱学原理为基础[4]。对流式分选的染色体进行 PCR 标记[5]，直接标记荧光素或间接标记半抗原。5 种光谱学不同的纯色染料进行组合得到独特的染色体探针混合物。探针混合物与中期染色体杂交，用高级的图像分析方法进行检测。图像抓取（图 1）用常规荧光显微镜和专门设计的三重滤光片（SKY CUBE™，Applied Spectral Imaging）完成。该设计中，光线通过 Sagnac 干涉仪聚焦到一个电感耦合摄像装置（CCD）上。光谱图像用购买的 SD200 Spectral Bio-Imaging System（ASI Ltd.，MigdalHaemek，Israel）进行抓取和分析。生成的 SKY 图像是通过对同一图像抓取约 100 个彼此之间只存在光学通路差异（OPD）的画面完成的。收集的这些图像经过傅里叶转换，在软件（SKYVIEW™）中进行数据筛选。每条染色体具有 5 种纯色染料中的一种或几种组合而成独特的光谱“标签”。得到一个光谱图像后，SKYVIEW™软件将抓取的图像与组合库中每条染色体的荧光素组合做比较，产生一个“分类”的结果。这个“分类”图像用不同假颜色涂染所有的染色体来确定特殊的结构异常，用 RGB（红 绿 蓝）图像显示各染色体荧光素颜色可能非常相似（图 1)。逐个像素的测量每个染色体区域的激发光谱进行鉴定。发生在不同染色体之间的重排或易位区域将观察到该位点染色体颜色的改变（图 2A)。

SKY 最明显的局限性在于它不能检测到缺失或其他染色体内的结构改变，如倒位。然而，对于肿瘤细胞的染色体异常分析，SKY 方法是必需的。SKY 具有明确的染色体涂染方式而便于解释结果，因此分析工作不需要经验丰富的人员完成中期染色体分析。另外，SKY 方法可对抓取的图像进行客观地分析，对涉

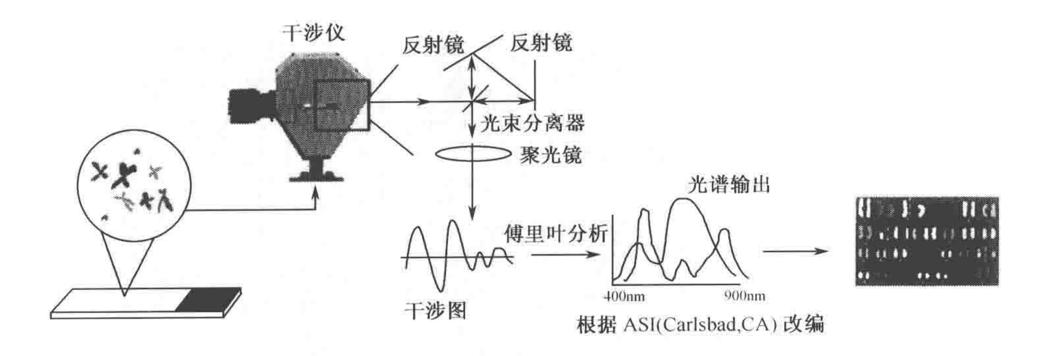


图 1 用装备有一个干涉计的镜头（Applied Spectral Imaging，Carlsbad，CA）抓取图像的示意图，包括杂交样本图像的采集、傅里叶转换和处理。

及约 2Mb DNA 的微小易位也能被发现[6]。这样小的染色体区域很难用常规带型分析确切地检测到。因此，SKY 提供了一种快速的高分辨筛查肿瘤细胞核型的方法，也正应用在研究和临床的细胞遗传学实验室中。

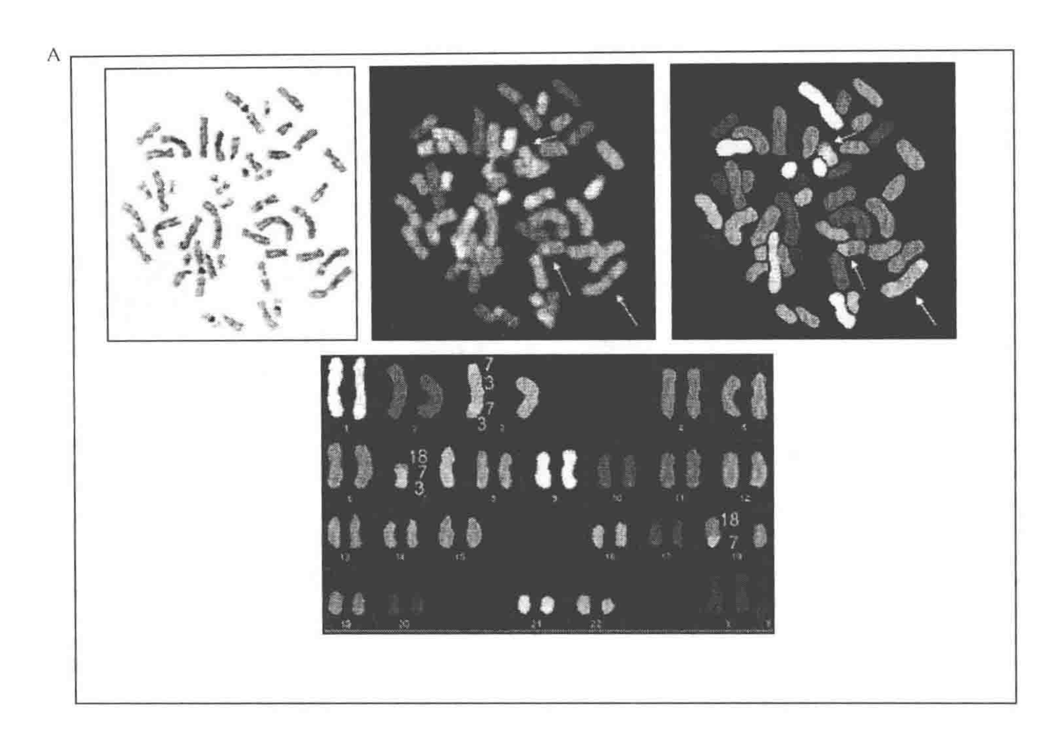
到目前为止，SKY 是应用最广泛的 24 色 FISH 分析方法。可以用于检测多种肿瘤包括恶性血液疾病[7～13]、癌症[14～20]、肉瘤[21～27]和脑肿瘤[28,29]中。SKY 对于临床遗传学的贡献从大量有关各种综合征分析的出版物可以得到证明[30～32]，而且还用于辅助性生殖技术的分析[33～37]。SKY 成功用于鼠类动物来阐述各种与人类肿瘤小鼠模型[38～50]相关的科研问题（图 2B）。在过去的 4～5 年里，SKY 作为一种非常方便和结果易于解释的分子细胞遗传学有效筛查技术逐渐得到广泛关注。

1.1 探针制备

SKY 探针可以购买成品，这些探针是用流式细胞仪分选的染色体经 DOP-PCR 扩增和标记制备而成[5]。这种 24 色染色体探针混合物是由 5 种纯色染料组合成的，5 种染料能够得到 2^n-1 或 31 种的组合。每条染色体独特的颜色是基于在一次图像抓取中用专门的三重滤光片（SKYCube™）检测到的每种荧光素独特的光谱特性。商业化的染色体探针一般用的流式细胞仪分选每一条染色体[2]。因此，在应用 SKY 软件时，必须优先选择正确的光谱参数设定和荧光素组合对图像进行数据抓取和分析。

1.2 从组织中制备染色体

SKY 在临床和研究分子细胞遗传学实验室中的应用，在于它能够杂交和检



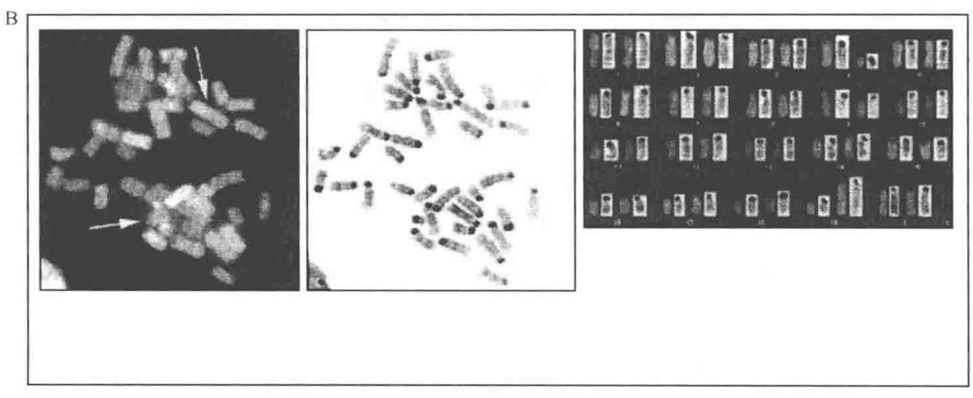


图 2　肿瘤细胞中期染色体标本的 SKY 分析。（A）SKY 分析一例人类软组织肉瘤。左上图是对中期染色体分裂相 DAPI 带型的反转，可以用类似 G 带的模式识别染色体区域。上方中间的图是同一个中期图，箭头指的是发生重排的染色体。右上图是用 SKY 分析发现的异常染色体。中间的图是 SKY 分析后得到的排列 SKY 核型，能够清楚地看到 3、7 和 18 号染色体的结构改变。（B）SKY 分析一例鼠纤维肉瘤。左下图是鼠的中期染色体分裂相图，箭头所指是发生异常的染色体；中间图是对中期染色体 DAPI 带型进行反转，可以用类似 G 带的模式识别染色体区域。右下图是排列的 SKY 核型，能清楚地看到异常的染色体。

测基因组的所有染色体。因此，必须先制备中期染色体。不管待检样品来自造血系统还是实体瘤，细胞都必须具有有丝分裂活性，在经过短期培养后才能得到足够的优质中期分裂相。阻断剂如秋水仙胺能够阻止纺锤体形成，将细胞阻断在细胞分裂中期。适当的秋水仙胺处理时间和浓度是试验的关键。细胞固定包括低渗处理使细胞胀大、慢慢加入甲醇∶冰乙酸固定液。仔细小心地进行低渗处理和第一次甲醇∶冰乙酸固定能得到没有细胞碎片和胞质残留的细胞悬液。经验丰富的细胞遗传学工作者都知道进行显带和各种 FISH 试验的染色体标本质量，很大程度上受制片时的干燥环境和片龄的影响。制片时的湿度和温度严重影响固定液的蒸发速度。必须控制干燥时间，因此当总体湿度低于 30%时，需在加湿器或产生水蒸气的设施旁进行制片。近年来，Thermotron 公司出品的一种可调控的环境蒸发室，提高了制片的稳定性，已在许多临床实验室中应用。考虑到进行 SKY 试验的成本，建议一定要保证染色体标本质量和片龄的一致性。

1.3 染色体标本的预处理和变性

制备好染色体标本后，必须首先评估标本是否需要进行预处理。进行 SKY 试验前，所有的染色体标本都应在相差显微镜下进行观察分析。细胞碎片和胞质残留物的存在可能导致无法避免的背景，但可以通过蛋白酶处理去除。蛋白酶预处理后，标本 DNA 必须变性成为单链才能与标记探针进行杂交，一般标本在 70%甲酰胺溶液中热变性即可。采用甲酰胺是因为它能降低 DNA 的熔解温度，因此 75℃的甲酰胺溶液足以变性 DNA 成为单链。靶 DNA 变性结束后，必须迅速地转入 70%乙醇中，随后通过浓度增高的系列乙醇，保证靶 DNA 处于单链状态，并除去所有残留的水分。靶 DNA 的变性是所有以 FISH 相关分析中最关键的步骤。变性不够将导致杂交效率低，探针与靶 DNA 的结合少；过度变性会破坏 DNA 结构，也会降低杂交效率。

1.4 探针变性

和靶 DNA 一样，SKY 探针必须变性成单链状态才能进行杂交。探针一般购买时就已经溶解在含有甲酰胺和硫酸葡聚糖的杂交液中。如上面所述，甲酰胺能降低 DNA 熔解温度。FISH 探针中未标记的 Cot 1-DNA 能抑制探针和人类基因组中广泛存在的重复序列杂交。因此，探针必须在 75℃变性，然后在 37℃进行预复性，Cot 1-DNA 与这些高度重复序列杂交，封闭重复序列的背景信号。因为 Cot 1-DNA 代表 DNA 序列中复性速度最快的那部分序列，37℃温育 1h 不会使标记 DNA 探针重新复性。

1.5 杂交

标本上的靶 DNA 和探针 DNA 都变性后，将探针加到标本上，37℃杂交至少 48h。杂交的信号强度主要由靶 DNA 的变性程度决定。另外，染色体周围残留的细胞碎片和胞质残留在很大程度上会影响探针与 DNA 的杂交。

1.6 杂交后洗脱和检测

杂交后洗脱和检测将占用大量的试验时间。用较低浓度的甲酰胺溶液 45℃洗脱，随后用 1×SSC 45℃洗脱去除未结合的探针。像许多杂交实验一样，免疫检测步骤中的封闭这一步是为了降低免疫检测过程中的背景和噪音。封闭液通常是含有牛血清白蛋白和去污剂的等渗缓冲液。商品化 SKY 探针是一些特殊染色体涂染探针的组合，其中一些涂染探针是直接标记在 DNA 上的荧光素，另一些涂染探针是间接标记的半抗原。试剂盒中提供的检测试剂含有间接标记探针的抗体。在与抗体温育的各个步骤之间，用去污剂洗脱掉可能产生背景的未结合残留抗体。洗脱的时候轻轻振荡有助于降低可能由细胞碎片和细胞质残留造成的背景。最后一步是用 DAPI 和抗淬灭剂溶液复染 DNA。标本保存在－20℃条件下使信号能够保持几个月。

1.7 图像抓取

为成功地对细胞遗传病例进行 SKY 分析，不仅正确的制片、前处理、DNA 变性和严格的杂交后洗脱很重要，而且最大程度地利用图像抓取和分析软件也同样重要。如上面所述，差别标记的全染色体涂染探针是根据它们独特的光谱特性而区分彼此。使用配置有 SKYCUBE 的荧光显微镜，光线通过 Sagnac 干涉仪聚焦到 CCD 上。生成的 SKY 图像是通过对同一图像抓取约 100 个彼此之间只存在光学通路的差异（OPD）的画面完成。这些图像经过傅里叶转换，在软件（SKYVIEW™）中进行数据筛选。每种像素的光谱特性与来自 SKYVIEW™ 软件的光谱或组合库进行比较。图像抓取时间通常依赖于荧光强度，尽管信号强度对 SKY 分析准确性的影响不是最关键的。只要每种染料的光谱特性存在，较弱的荧光同样能得到可靠的结果。所以，探针混合物荧光的保真度和随后的免疫组化检测是非常重要的。

1.8 SKY 探针与做过 G 显带的中期染色体标本的杂交：染色体前处理

某些情况下，也许需对曾进行 G 显带的染色体标本进行 SKY 分析。这一实验对于证实一个特异中期染色体分裂相中无结论的染色体异常尤其重要。这种情况下，需要对研究的中期染色体分裂相 G 带进行拍照，记录显微镜坐标，并尽可能快的进行 SKY 分析（如 2 周以内）。对于片龄较长的标本，标本的储存参数如湿度和环境温度大大影响成功率，因此找到标本制备和储存的方法非常重要。如果要研究患者的标本剩余很有限，有时可用同样片龄的其他样品的多余标本来摸索出老化和储存的最佳条件。

2. 材料

2.1 探针

Applied Spectral Imaging（MigdalHaemek，Israel）试剂盒的瓶 1。

2.2 从组织中制备染色体

1. 组织样本。
2. 适合短期培养的组织培养基。
3. 解剖刀和刀片。
4. 无菌培养皿。
5. 有通气孔的组织培养瓶和无菌滴管。
6. 37℃ CO_2 培养箱。
7. 秋水仙胺（10mg/mL，Gibco-BRL）。
8. 37℃预热的 1×胰酶（Gibco-BRL）。
9. 室温条件下的柠檬酸盐。
10. 37℃预热的 0.075mol/L KCl 。
11. 37℃温箱或水浴锅。
12. 15mL 锥形底离心管。
13. 组织培养离心机。
14. 甲醇：冰乙酸＝3：1（V：V）。
15. 载玻片（Fisher）。
16. 200μL 微量移液枪和枪头。

17. 玻片储存盒。

2.3 标本预处理和变性

1. 老化 2～3d 的中期染色体标本。
2. 储存在塑料或玻璃染色缸中的冷乙醇系列：70%、80%和 95%。
3. 小镊子。
4. 75℃水浴锅。
5. 去离子甲酰胺（蒸馏高纯度）。
6. 20×SSC。
7. 10%（*m*/*V*）胃蛋白酶。
8. 在 37℃温箱或水浴锅中预热 0.01mol/L HCl。
9. 室温的 1×PBS。
10. 1×PBS/50mmol/L $MgCl_2$，室温。
11. 1%甲酰胺/1×PBS/ $MgCl_2$，室温。
12. 定时钟。

2.4 探针变性

1. 分装的标记探针。
2. 75℃水浴锅或 PCR 仪。
3. 37℃水浴锅或 PCR 仪。

2.5 杂交

1. 按本章 2.3 中操作步骤变性中期染色体。
2. 按本章 2.4 中操作步骤变性探针。
3. 玻璃或塑料盖玻片（22mm×20mm）。
4. 10μL 或 20μL 微量移液枪和枪头。
5. 橡皮泥。
6. 杂交盒。
7. 塑料袋。
8. 37℃温箱。

2.6 杂交后洗脱和检测

1. 镊子。

2. 45℃水浴锅。

3. 装有 50%甲酰胺/2×SSC 的 3 个塑料或玻璃染色缸，45℃预热。

4. 装有 1×SSC 的 3 个塑料或玻璃染色缸，45℃预热。

5. 装有 0.01% Tween-20/4×SSC 的 7 个塑料或玻璃染色缸，45℃预热。

6. 装有 2×SSC 的 1 个塑料或玻璃染色缸，室温条件下放置。

7. Applied Spectral Imaging 提供的试剂盒。瓶 2：封闭试剂；瓶 3：检测试剂；瓶 4：检测试剂；瓶 5：DAPI/抗淬灭剂溶液。

8. 可在－20℃冰箱储存的塑料玻片盒。

9. 22mm×30mm 玻璃盖玻片。

2.7 图像抓取

1. 附有 Applied Spectral Imaging Optical Head 的荧光显微镜。

2. Spectral Imaging 抓取图像软件（Applied Spectral Imaging）。

3. SKYVIEW 分析软件（Applied Spectral Imaging）。

2.8 SKY 探针与曾 G 显带过的中期染色体片的杂交：玻片预处理

1. 2 染色缸的二甲苯。

2. 2 染色缸的甲醇。

3. 储存在塑料或玻璃染色缸中的冰冷系列乙醇：70%、80%和 95%。

3. 方法

3.1 探针

已经标记好的商品探针以混合形式溶解在杂交液中。

3.2 从组织中制备染色体

1. 在组织培养用的超净工作台中进行无菌操作，在无菌培养皿中，用刀片将组织切碎成细小的块。

2. 将细碎的组织块转入有足够培养基的、具有通气孔的组织培养瓶中；培养基要盖过平面放置的培养瓶底（通常 10～15mL）。

3. 将培养瓶放入 CO_2 培养箱中，静置培养 24h。

4. 光镜下观察其生长状态。

5. 当达到要求的生长状态或培养时间时，向培养瓶中加入秋水仙胺至终浓度 10μg/mL，在 CO_2 培养箱中继续培养 2～3h（见注释 1）。

6. 将培养基和悬浮的组织或细胞一起转移到 15mL 锥形底离心管（见注释 2）。对于非贴壁细胞，继续步骤 10。

7. 向培养瓶中加入 10mL 柠檬酸盐溶液，漂洗贴壁的细胞，弃去柠檬酸盐溶液。

8. 向培养瓶中加入 10mL 1×胰酶。观察贴壁细胞自培养瓶壁上脱离，轻轻吹打，将细胞自瓶壁上吹打下来，转移到 15mL 锥形离心管中。

9. 向含有贴壁细胞的 15mL 锥形离心管内加入 5mL 新鲜配置的培基（见注释 3）。

10. 1500*g* 离心 10min 收集细胞。

11. 倒掉或吸出上清，只留下 0.5～1mL 溶液。用手指轻轻敲打管底，打散细胞团。

12. 加入预热的 0.075mol/L KCl 溶液，开始的 1mL 逐滴加入，滴加中间混匀（见注释 4）；然后将剩下的 14mL 加入并轻轻颠倒混匀，37℃放置 10min。

13. 加入 5 滴比例为 3∶1 的甲醇∶冰乙酸，混匀（见注释 5）。

14. 1500*g* 离心 10min。

15. 倒掉或吸出上清，打散细胞团（见注释 6）。加入新鲜配置的甲醇∶冰乙酸（3∶1）固定液 15mL，用上述的方法开始的 1mL 逐滴加入，滴加中间混匀；然后加入剩余的 14mL 固定液，并轻轻颠倒混匀。

16. 1500*g*，离心 10min。

17. 重复步骤 15 的固定。然而，最初的 1mL 不需要逐滴加入。离心，重复固定 3 次。

18. 细胞悬液可以以固定液中细胞团的状态－20℃保存。

19. 为了进行染色体标本制备，倒掉固定液，重悬细胞团块，加入适量的新鲜固定液使悬液轻度浑浊。

20. 用 200μL 的枪，吸取 100μL 悬液，滴到干净的载玻片上（见注释 7），室温下晾干并储存片子。滴好的片子至少自然老化 2d 或 37℃过夜老化。

3.3 染色体标本预处理和变性

1. 染色体标本至少自然老化 2d 或用前 37℃过夜。

2. 染色体标本在系列乙醇（70％、80％和 95％）中分别脱水 5min，晾干。

3. 加入 15～20μL 的 10％胃蛋白酶储存液（见注释 8）到 50mL 预热的 0.01mol/L HCl 中，将染色体标本在 37℃染色缸中温育 5min（见注释 9）。同

时，准备一缸 70%甲酰胺/2×SSC 溶液并放入 75℃水浴中预热。

4. 取出标本，在室温下的 1×PBS 中漂洗 5min。

5. 在 1×PBS/$MgCl_2$ 室温温育 5min。

6. 向 50mL 1×PBS/$MgCl_2$ 中加入 1.5mL 37%甲醛，在室温下的该溶液中温育标本 10min（见注释 11）。

7. 在室温中的 1×PBS 中漂洗 5min。

8. 按步骤 2 中所述方法再次进行系列乙醇脱水。

9. 晾干片子后，检查甲酰胺溶液的温度是否达到 75℃（见注释 11）；将染色体标本在 75℃甲酰胺溶液中变性 2min。

10. 迅速将标本转移到冰冷的 70%乙醇中并用系列乙醇脱水（见注释 12）后晾干。

3.4 探针变性

1. 对于每张标本，22mm×22mm 盖玻片的范围内需要用 10μL 探针；如果该区域大于此范围，增加探针的使用量。取适量的探针到一个 Eppendorf 管中。

2. 在水浴锅或 PCR 仪上 75℃热变性探针 10min。

3. 将探针于 37℃水浴中预复性 1h。

3.5 杂交

1. 从 37℃中取出预复性的探针，小心的加到变性的中期染色体标本上。因为探针既有直接标记又有间接标记，应迅速操作并避免长时间暴露在光线条件下。

2. 小心的盖上盖玻片，注意不要产生气泡。如果出现气泡，轻按盖玻片，将气泡挤出。

3. 用橡皮泥封好盖玻片边缘。

4. 放入杂交盒（见注释 13），并放入塑料袋中（可选择的），在 37℃条件下杂交 48h。

3.6 杂交后洗脱和检测

1. 在 45℃水浴中预热所有的溶液。

2. 从杂交盒中取出片子，小心除去橡皮泥。盖玻片也许随橡皮泥一块揭去或仍留在片子上。如果盖玻片留在片子上，直接将标本放入第一缸洗脱液。

3. 在 50%甲酰胺/2×SSC 中洗 3 次，每次 5min。在第一次洗脱时盖玻片应

滑掉。轻轻振荡染色缸几秒钟（见注释 14）。

4. 在 1×SSC 中洗片 3 次，每次 5min 并轻轻振荡。

5. 标本浸在 0.01%Tween-20/4×SSC 中，取出标本，甩掉多余的液体，但保持片子表面湿润。

6. 取 30～40μL SKY 试剂盒（Applied Spectral Imaging 提供）的瓶 2 中的封闭液加到标本上，盖上盖玻片。

7. 将标本放回杂交盒，37℃温育 30min。

8. 小心移开盖玻片，取 30～40μL SKY 试剂盒（Applied Spectral Imaging 提供）的瓶 3 中的检测溶液加到片子上，并盖上盖玻片。

9. 将标本放回杂交盒，37℃温育约 30min。

10. 小心移开盖玻片，在 0.01% Tween-20/4×SSC 中洗 3 次，每次 5min。轻轻振荡。

11. 甩掉多余的液体，取 30～40μL SKY 试剂盒（Applied Spectral Imaging 提供）的瓶 4 中的检测溶液加到标本上，盖上盖玻片。

12. 将标本放回杂交盒，37℃温育 30min。

13. 小心移开盖玻片，在 0.01% Tween-20/4×SSC 中洗片 3 次，每次 5min。轻轻振荡。

14. 在室温下的 2×SSC 中漂洗片子。

15. 用 15～20μL 瓶 5 中的 DAPI/抗淬灭剂封片，盖上盖玻片，避免产生气泡。

16. 可以进行阅片。标本应在－20℃保存。

3.7 图像抓取

1. 尽可能及时的进行图像抓取和分析。尽管荧光素在－20℃并尽可能少的光线条件下能保存几个月，但随着时间的延长，信号强度会减弱（见注释 17～20）。

2. 在实验室安装系统时进行用该系统抓取图像和分析的培训。

3.8 用 SKY 探针与曾 G 显带过的中期染色体标本的杂交：标本预处理

1. 在室温下的二甲苯中洗 2 次，每次 5min，除去 G 带标本上残留的镜油（见注释 15）。

2. 将标本浸在甲醇中 10～15min 褪色，或直到标本完全褪色。

3. 标本褪色后，进行系列乙醇再水合：95%、80% 和 70% 乙醇，每次

5min，晾干。

4. 继续从本章 3.3 的步骤 5 开始。

5. 如果标本曾显带过，在 70%甲酰胺/2×SSC 中变性时间需调整以反映标本特性（见注释 16 和表 1）。保守变性时间为 40s。

表 1　可获得好的染色体带型和随后的 SKY 杂交效果的 G 显带实验建议步骤

实验步骤	片龄 3d 至 1 个月	片龄（超过 1 个月）	原位杂交标本 3d 至 1 个月	原位杂交标本（超过 1 个月）
胰酶（5% *m*/*V* 储存液）1/100 倍稀释	10～20s，轻轻振荡	20～30s，轻轻振荡	40～60s，轻轻振荡	60～90s，轻轻振荡
生理盐水	短暂漂洗	短暂漂洗	短暂漂洗	短暂漂洗
生理盐水	短暂漂洗	短暂漂洗	短暂漂洗	短暂漂洗
染色（Giemsa）	50s	>1min	50s	>1min
水	短暂漂洗	短暂漂洗	短暂漂洗	短暂漂洗
水	短暂漂洗	短暂漂洗	短暂漂洗	短暂漂洗
变性时间	20～30s	45s～1min	30～45s	1min～?

6. 其他所有的步骤，探针变性、杂交、杂交后洗脱和检测同上。

4. 注释（参考表 2 中的常见问题的解决途径）

1. 如果材料充足，尝试不同的秋水仙胺作用时间，以得到最适合细胞遗传学分析的染色体长度。通常，不同组织和肿瘤类型之间的生长模式也不同。对于生长较慢的细胞，秋水仙胺过夜处理能得到较多的中期分裂相，但这种处理要求秋水仙胺的浓度相当得低。而对生长较快的细胞，秋水仙胺作用时间较短，可能只需要 30min，就能够成功将大量细胞阻断在中期进行标本制备。通常建议在收获细胞前一天进行半量换液，从培养瓶中取出一半的培养基，加入等量的新鲜培养基。细胞对秋水仙胺的敏感性也是获得好的中期染色体分裂相的关键因素。试验发现：一些肿瘤细胞对秋水仙胺的耐受程度很低，很容易得到短粗的染色体。相应降低秋水仙胺的终浓度并延长作用时间可以在某种程度上减弱这种现象，但可能会导致一定数量的中期染色体分裂相减少。

2. 培养基中既有悬浮细胞也有贴壁细胞时，为保证标本制备中收集到所有的肿瘤细胞，建议同时收集悬浮在培基中的细胞。收集后，将这些细胞加入到胰酶处理得到的其他贴壁细胞中。

3. 用含有胎牛血清的新鲜培养基漂洗收集的细胞有助于灭活胰蛋白酶。既然胰蛋白酶是一种蛋白酶，过长时间的胰蛋白酶处理会破坏细胞膜、损伤 DNA。

4. KCl通常用作低渗液使细胞胀大。最初的1mL溶液要逐滴加入，防止水液体的冲击造成细胞破裂释放细胞内容物。加入每滴溶液后都轻轻混匀，确保低渗液和细胞悬液混匀。37℃的微热处理令细胞胀大得更快。如果没有37℃温育，室温放置30min也能充分的胀大细胞。如果细胞没有胀大（见注释5），依次延长低渗温育时间5min再进行随后的收获步骤。

5. 低渗胀大后的细胞非常敏感。逐滴加入甲醇：冰乙酸固定液进行预固定，有助于坚固细胞膜以进行之后的离心和固定。加入固定液也会破碎所有的红细胞。离心后，细胞团块的大小应会加倍，说明低渗处理的成功。

6. 细胞离心成团后，去上清。上清中可能含有破碎的膜和细胞质物质。轻敲锥形离心管底使细胞团块重悬。逐滴加入固定液有助于使固定液缓慢进入胀大的敏感细胞。

7. 有许多种方法可用来进行中期染色体标本的制备。某些实验室用1mL一次性球形吸管、玻璃滴管或移液枪将固定好的细胞滴加到载玻片上。尤其当细胞数量少时用200μL的移液枪便于控制细胞悬液的使用量。细胞悬液通常滴加到倾斜45°角的载玻片上，可以是干片，也可以是浸在水或固定液中的湿片。这些不同的制片方法来自于不断摸索。比较潮湿的房间或季节会影响制片效果。如果空气太干燥，用加湿器或用沸腾的壶水或电热板加热水产生的水蒸气来提高空气湿度。如果环境太潮湿，将玻片放在电热板上几秒钟，加快干燥速度。制备的标本需经常在相差显微镜下观察，以确定目前的制片方法是否合适。为确保SKY实验的成功，标本上分裂相周围的胞质尽可能得少、染色体不能太长或相互交叉。根据需要调节细胞浓度。通常染色体呈深灰色，依稀能看见带型。标本可以保存在室温下的玻片盒中，并在两周内使用，也可在第二天尽快使用。当标本开始老化后，将更难于变性，发生降解使DNA毫无用处。

8. 胃蛋白酶是用于前处理的最温和的蛋白酶。配制10％（*m*/*V*）的胃蛋白酶储存液并分装，可以在－20℃条件下几乎永久保存。按每次的使用量分装胃蛋白酶。每一批新的胃蛋白酶都是不同的，因此获得最干净标本的前处理的使用量可能不同。

9. 一种能控制蛋白质消化程度的保守方法是用等量的胃蛋白酶，但延长温育时间。提高胃蛋白酶的使用量要求更严格的计时，相形比之下前一种方法更有弹性。轻轻振荡能够促进胞质碎片的松开。蛋白酶处理后可以在相差显微镜下观察蛋白质的消化程度，但需要在甲醛固定之前（见3.3步骤6）。

10. 甲醛有助于维持染色体形态，但也造成DNA难于变性。尽管2min的变性时间足以将DNA成为单链，对于片龄比较长的标本（超过2个月）甲醛处理可使变性时间缩短。如果是片龄比较长的标本，缩短甲醛处理时间到5min。之前曾G显带过的标本，经过胰酶消化显带和热处理人工老化的剧烈处理，用甲醛固定有助于维持染色体的形态。

11. 用甲酰胺作变性液，因为它能够降低 DNA 的熔点。用温度计测量保证甲酰胺溶液达到变性温度。塑料染色缸内的溶液一般比外面水浴锅的温度低 3～4℃，因此应提高水浴锅的温度。玻璃染色缸更易于传热；在染色缸中每加一张标本溶液温度会降低，因此每增加一张变性标本水浴锅的温度就大约上调 1℃。所以，使用玻璃染色缸变性 5 张标本时，水浴锅的温度应设定在 78～79℃，这样变性液的温度在 74～75℃。2min 是变性的标准时间，然而，可以根据标本的质量和片龄调整变性时间。对于新鲜制备的标本（片龄 1～3d），DNA 可能还没有完全老化，尽管用甲醛固定促进老化，但 DNA 仍然很脆弱，将变性时间缩短到 90s 就足够了。杂交后在显微镜下观察确定标本是否过度变性，染色体可能发生胀大，沿着每条染色体或染色单体的轴具有可见的骨架，或者边缘清晰但染色黯淡的染色体。变性过度的标本不能像适当变性的标本一样被 DAPI 复染，一般只有着丝粒呈现亮荧光染色。因为过度变性破坏了 DNA 结构，也可能只有少数探针与靶 DNA 杂交。片子变性不够的时候，镜下观察到染色体完整但杂交信号分布不均。染色体容易被 DAPI 着色，说明 DNA 没有被过度处理，结构没有被破坏。

12. 标本变性是 FISH 相关试验最关键的步骤。标本变性结束，必须立刻转移到 70%的乙醇中以保持 DNA 的单链状态，乙醇可以是冰冷或室温的。并不需要每一步都更换乙醇，70%乙醇可以一次试验后进行更换，80%和 95%乙醇可以一次加满后，每 2 次试验后进行补充。如果没有条件在－20℃保存乙醇，也可以室温保存，但是必须密闭保存以免蒸发。

13. 任何不透光的容器都可以作为杂交盒，黑色录像带盒就是一种非常好的杂交盒。尽管盒子并不需要潮湿，但我们的经验是用一片湿纸巾或湿纱布（不要湿透）垫在盒底会有利于杂交。一定要用干净的蒸馏水，因为细菌可能会在片子上生长，与抗体结合后产生不必要的背景。也可以选择将杂交盒放在塑料袋中，防止杂交盒干透。

14. 杂交后的所有洗脱都应该伴随轻轻振荡，将未结合的抗体或探针洗脱下来使标本干净；确保所有试剂中无可以结合抗体的任何细菌。如果在 UV 显微镜下背景很高，应加大洗脱力度：每一步增加一次洗脱并更剧烈的振荡，或调节溶液浓度。以 Tween-20 的浓度为例，可以在 0.01%～0.2%进行调节。洗脱或抗体温育的过程中如果标本干了，也会产生背景。

15. 之前曾进行过 G 显带的标本通常是来自临床细胞遗传学实验室的唯一样品来源。这些标本的保存和预处理使进行随后的 FISH 分析难度很大；然而有几步操作可以提高其 FISH 的成功率。表 1 列出一些要进行 SKY 分析的 G 带标本制备应遵循的原则。G 带分析后，这些标本可以用二甲苯或其他试剂处理去除残留镜油，因为这些镜油能快速降解 DNA。如果标本已经封片，封片剂也可能降解 DNA，这可能是无法避免的，但是通过调节蛋白酶处理（这步可以省略因为

G 显带标本用胰蛋白酶处理过)、变性时间和甲醛固定等，以避免进一步损坏 DNA。

16. 之前进行过 G 显带的标本变性时应调节变性时间。在 G 显带过程中，DNA 已经剧烈作用过，包括胰酶消化去掉细胞质和一些与 DNA 结合的蛋白质而强化带型，高温处理得到反差更好的染色带型。加上浸在镜油中，靶 DNA 通常是相当脆弱的状态，因此变性时间缩短到 40s。也可以在正式实验前，用同样制备和处理方式的其他来源标本进行预实验。这将为分析是否有效、标本可以承受多少处理提供依据。

17. 尽量拍摄周围无细胞核的中期染色体分裂相。虽然染色体的荧光通常跟周围的核一样或更强一些，但较小的细胞核发出的非常强的荧光将改变中期染色体分裂相的荧光强度，因为抓取图像时会自动调节对比度。

18. 抓取图像的时候尽量避免拍到明亮的斑点。和上面所述的原因相同，结合抗体造成的外源性亮点不能被洗脱掉，会导致靶染色体的信号强度降低。

19. 如果可能，尽量选择相互交叉少的中期染色体分裂相。但在中期染色体分裂相数量很少或者细胞悬液中染色体长时这种情况就不可避免。染色体的交叉可能导致“易位”的错误判断，因为染色体交叉结合在一起形成的荧光组合可能与 SKY 光谱库中的某种模式一致。

20. 为节省硬盘空间和缩短图像抓取时间，只选择有意义的中期染色体分裂相进行图像抓取，而避开中期分裂相周围的大片无信号区域。

表 2 SKY 试验中的常见问题

	标本	探针	技术
信号弱	片龄：要得到好的观察结果，片龄不能超过 2 个月。片龄越长，越难变性。非常老的标本 DNA 发生降解，不能进行 FISH。之前进行过 G 显带的标本寿命更短，不能超过 2 周 变性时间：片子越老，染色体越难变性成单链。1～2 周内制备的标本变性时间应该为 1.5～2min。片龄更长的标本变性时间范围为 2～3min 胞质残留：残留的细胞质将抑制结合，产生背景。需进行作用更强的蛋白酶预处理 过度预处理：过度的酶预处理可能会损伤标本靶 DNA，使杂交效率下降	商品化探针：通常公司会对产品进行质量监控。检查探针的保存是否恰当和是否在有效期内使用 探针浓度：相对于靶 DNA，探针通常是过量的；确保加到标本杂交区域上的探针数量足够覆盖要研究的区域	封片：将盖玻片严密的封好非常关键，避免水分进入杂交区域，稀释探针 温度合适：检查水浴锅或电热板的温度是否适合杂交或温育 温育时间：不要减少封闭液和检测试剂的温育时间。并确保标本没有干掉，以免增加洗脱难度

续表

	标本	探针	技术
背景	细胞质残留：这是产生背景的最常见的原因。延长蛋白质消化的时间或者保持时间不变，改变酶的浓度 细菌/酵母污染：与标本一起温育的微生物可能在片子上生长，很遗憾这是无法避免的 盖玻片：如果细胞进行原位培养，只采用玻璃盖玻片；塑料盖片会产生自发荧光 残留的镜油：之前用镜油观察过的片子应该用二甲苯清洁。残留的油会影响杂交，产生背景	商品探化针：通常不会产生背景，然而可以记录产品批号为以后参考提供依据	杂交后洗脱：确保正确的洗脱和温育温度。洗脱时轻轻振荡能帮助洗掉未结合的探针和抗体。通过提高温度和改变溶液中 SSC 的含量可以提高洗脱严格度也有助于洗掉未结合的探针和抗体。加封闭和检测试剂时需要注意标本不能干
信号减弱	NA	商品化探针：尽管这些探针被认为是经过质检的，但和自备探针有同样的局限性。记下商品化探针的产品批号和过期时间	抗淬灭剂：检查 DAPI/抗淬灭剂溶液是否在有效期内。抗淬灭剂通常是淡粉色，当变成棕黄色的时候不能使用。过期的抗淬灭剂会使信号迅速降解，镜下观察发出红光
染色体形态差	过度变性：通常造成染色体形态模糊的原因是过度变性导致的 DNA 结构破坏，这与标本特异性和（或）片龄有关	NA	变性温度：检查变性温度是否准确。染色缸内溶液的最终温度应为 72℃，每增加一张片子就提高 1℃；一次变性尽量不要超过 5 张片子。比起玻璃染色缸，塑料染色缸导致水浴锅和染色缸溶液温度差异更大
之前进行过 G 显带的标本	处理过度：胰酶过度处理显带的片子其 DNA 对变性敏感。因此应缩短变性时间，这也可能会影响杂交质量和信号强度		

（陈　艳 译，刘青杰 校）

参考文献

1. Speicher, M. R., Gwyn Ballard, S., and Ward, D. C. (1996) Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat. Genet.* **12,** 368–375.
2. Schrock, E., du Manoir, S., Veldman, T., et al. (1996) Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes [*see* comments]. *Science* **273,** 494–497.
3. Malik, Z., Dishi, M., and Garini, Y. (1996) Fourier transform multipixel spectroscopy and spectral imaging of protoporphyrin in single melanoma cells. *Photochem. Photobiol.* **63,** 608–614.

4. Bell, R. (1972) *Introductory Fourier Transform Spectroscopy.* Academic Press, London.
5. Telenius, H., Pelmear, A. H., Tunnacliffe, A., et al. (1992) Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. *Genes Chromosomes Cancer* **4,** 257–263.
6. Fan, Y. S., Siu, V. M., Jung, J. H., and Xu, J. (2000) Sensitivity of multiple color spectral karyotyping in detecting small interchromosomal rearrangements. *Genet. Test* **4,** 9–14.
7. Heim, S. and Mitelman, F. (1992) Cytogenetic analysis in the diagnosis of acute leukemia. *Cancer* **70,** 1701–1709.
8. Heim, S. and Mitelman, F. (1995) *Cancer Cytogenetics,* 2 ed. Wiley-Liss, Inc., New York
9. Johansson, B., Mertens, F., and Mitelman, F. (1993) Cytogenetic deletion maps of hematologic neoplasms: circumstantial evidence for tumor suppressor loci. *Genes Chromosomes Cancer* **8,** 205–218.
10. Markovic, V., Bouman, D., Bayani, J., Al-Maghrabi, J., Kamel-Reid, S., and Squire, J. (2000) Lack of BCR/ABL Reciprocal Fusion in Varian Ph Translocations: Use of Double Fusion Signal FISH and Spectral Karyotyping. *Leukemia* **14,** 1157–1160.
11. Rowley, J. D., Reshmi, S., Carlson, K., and Roulston, D. (1999) Spectral karyotype analysis of T-cell acute leukemia. *Blood* **93,** 2038–2042.
12. Rowley, J. D. (2000) Molecular genetics in acute leukemia. *Leukemia* **14,** 513–517.
13. Hilgenfeld, E., Padilla-Nash, H., Schrock, E., Ried, T. (1999) Analysis of B-cell neoplasias by spectral karyotyping (SKY). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **246,** 169–174.
14. Gray, S. G., Kytola, S., Lui, W. O., Larsson, C., and Ekstrom, T. J. (2000) Modulating IGFBP-3 expression by trichostatin A: potential therapeutic role in the treatment of hepatocellular carcinoma. *Int. J. Mol. Med.* **5,** 33–41.
15. Ghadimi, B. M., Schrock, E., Walker, R. L., et al. (1999) Specific chromosomal aberrations and amplification of the AIB1 nuclear receptor coactivator gene in pancreatic carcinomas. *Am. J. Pathol.* **154,** 525–536.
16. Ghadimi, B. M., Sackett, D. L., Difilippantonio, M. J., et al. (2000) Centrosome amplification and instability occurs exclusively in aneuploid, but not in diploid colorectal cancer cell lines, and correlates with numerical chromosomal aberrations. *Genes Chromosomes Cancer* **27,** 183–190.
17. Saunders, W. S., Shuster, M., Huang, X., et al. (2000) Chromosomal instability and cytoskeletal defects in oral cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97,** 303–308.
18. Beheshti, B., Karaskova, J., Park, P., Squire, J., and Beatty, B. (2000) Identification of a high frequency of chromosomal rearrangements in the centromeric regions of prostate cancer cell lines by sequential Giemsa-banding and spectral karyotyping. *Mol. Diagn.* **5,** 23–32.
19. Luk, C., Tsao, M., Bayani, J., Shepherd, F., and Squire, J. A. (2001) Molecular cytogenetic analysis of non-small cell lung carcinoma by spectral karyotyping and comparative genomic hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.* **125,** 87–99.
20. Macoska, J., Beheshti, B., Rhim, J., et al. (2000) Genetic Characterization of Immortalized Human Prostate Epithelial Cell Cultures: Evidence for Structural Rearrangements of Chromosome 8 and i(8q) Chromosome Formation in Malignant-Derived Cells. *Cancer Gen. Cyto.* **120,** 50–57.
21. Carlotti Jr, C. G., Drake, J. M., Hladky, J., Teshima, I., Becker, L. E., and Rutka, J. T. (1999) Primary Ewing's sarcoma of the skull in children. utility Of molecular diagnostics, surgery and adjuvant therapies [In Process Citation]. *Pediatr. Neurosurg.* **31,** 307–315.
22. Cohen, I. J., Issakov, J., Avigad, S., et al. (1997) Synovial sarcoma of bone delineated by spectral karyotyping [letter]. *Lancet* **350,** 1679–1680.

23. Joyama, S., Ueda, T., Shimizu, K., et al. (1999) Chromosome rearrangement at 17q25 and xp11.2 in alveolar soft-part sarcoma: A case report and review of the literature. *Cancer* **86,** 1246–1250.
24. Pandita, A., Zielenska, M., Thorner, P., et al. (1999) Application of comaparative genomic hybridization, spectral karyotyping, and microarray analysis in the identification of subtype-specific patterns of genomic changes in rhabdomyosarcoma. *Neoplasia* **1,** 262–275.
25. Safar, A., Nelson, M., Neff, J. R., et al. (2000) Recurrent anomalies of 6q25 in chondromyxoid fibroma [In Process Citation]. *Hum. Pathol.* **31,** 306–311.
26. Zielenska, M., Zhang, Z. M., Ng, K., et al. (2001) Acquisition of secondary structural chromosomal changes in pediatric ewing sarcoma is a probable prognostic factor for tumor response and clinical outcome. *Cancer* **91,** 2156–2164.
27. Barnard, M., Bayani, J., Grant, R., Teshima, I., Thorner, P., and Squire, J. (2000) Use of multicolor spectral karyotyping in genetic analysis of pleuropulmonary blastoma. *Pediatr. Dev. Pathol.* **3,** 479–486.
28. Bigner, S. H. and Schrock, E. (1997) Molecular cytogenetics of brain tumors. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **56,** 1173–1181.
29. Bayani, J., Zielenska, M., Marrano, P., et al. (2000) Molecular Cytogenetic Analysis of Medulloblastomas and Primitive Neuroectodermal Tumours Using Conventional Banding, Comparative Genomic Hybridization and Spectral Karyotyping. *J. Neurosurg.* **93,** 437–448.
30. Huang, B., Ning, Y., Lamb, A. N., et al. (1998) Identification of an unusual marker chromosome by spectral karyotyping. *Am. J. Med. Genet.* **80,** 368–372.
31. De Krijger, R. R., Mooy, C. M., Van Hemel, J. O., et al. (1999) CHARGE association-related ocular pathology in a newborn with partial trisomy 19q and partial monosomy **21q,** from a maternal translocation (19;21) (q13.1;q22.3). *Pediatr. Dev. Pathol.* **2,** 577–581.
32. Morelli, S. H., Deubler, D. A., Brothman, L. J., Carey, J. C., and Brothman, A. R. (1999) Partial trisomy 17p detected by spectral karyotyping. *Clin. Genet.* **55,** 372–375.
33. Krapp, M., Baschat, A. A., Gembruch, U., Gloeckner, K., Schwinger, E., and Reusche, E. (1999) Tuberous sclerosis with intracardiac rhabdomyoma in a fetus with trisomy 21: case report and review of literature. *Prenat. Diagn.* **19,** 610–613.
34. Peschka, B., Leygraaf, J., et al. (1999) Analysis of a de novo complex chromosome rearrangement involving chromosomes 4, 11, 12 and 13 and eight breakpoints by conventional cytogenetic, fluorescence in situ hybridization and spectral karyotyping. *Prenat. Diagn.* **19,** 1143–1149.
35. Haddad, B. R., Schrock, E., Meck, J., et al. (1998) Identification of de novo chromosomal markers and derivatives by spectral karyotyping. *Hum. Genet.* **103,** 619–625.
36. Ning, Y., Laundon, C. H., Schrock, E., Buchanan, P., and Ried, T. (1999) Prenatal diagnosis of a mosaic extra structurally abnormal chromosome by spectral karyotyping. *Prenat. Diagn.* **19,** 480–482.
37. Marquez, C., Cohen, J., and Munne, S. (1998) Chromosome identification in human oocytes and polar bodies by spectral karyotyping. *Cytogenet. Cell. Genet.* **81,** 254–258.
38. Barlow, C., Hirotsune, S., Paylor, R., et al. (1996) Atm-deficient mice: a paradigm of ataxia telangiectasia. *Cell* **86,** 159–171.
39. Coleman, A. E., Forest, S. T., McNeil, N., Kovalchuk, A. L., Ried, T., and Janz, S. (1999) Cytogenetic analysis of the bipotential murine pre-B cell lymphoma, P388, and its derivative macrophage-like tumor, P388D1, using SKY and CGH. *Leukemia* **13,** 1592–1600.
40. Coleman, A. E., Ried, T., and Janz, S. (1999) Recurrent non-reciprocal translocations of chromosome 5 in primary T(12;15)-positive BALB/c plasmacytomas. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **246,** 175–180.

41. Coleman, A. E., Schrock, E., Weaver, Z., et al. (1997) Previously hidden chromosome aberrations in T(12;15)-positive BALB/c plasmacytomas uncovered by multicolor spectral karyotyping. *Cancer Res.* **57,** 4585–4592.
42. Hardt, T., Himmelbauer, H., Mann, W., Ropers, H., and Haaf, T. (1999) Towards identification of individual homologous chromosomes: comparative genomic hybridization and spectral karyotyping discriminate between paternal and maternal euchromatin in Mus musculus x M. spretus interspecific hybrids. *Cytogenet. Cell. Genet.* **86,** 187–193.
43. Liyanage, M., Coleman, A., du Manoir, S., et al. (1996) Multicolour spectral karyotyping of mouse chromosomes. *Nat. Genet.* **14,** 312–315.
44. McCormack, S. J., Weaver, Z., Deming, S., et al. (1998) Myc/p53 interactions in transgenic mouse mammary development, tumorigenesis and chromosomal instability. *Oncogene* **16,** 2755–2766.
45. Shen, S. X., Weaver, Z., Xu, X., et al. (1998) A targeted disruption of the murine Brca1 gene causes gamma-irradiation hypersensitivity and genetic instability. *Oncogene* **17,** 3115–3124.
46. Weaver, Z. A., McCormack, S. J., Liyanage, M., et al. (1999) A recurring pattern of chromosomal aberrations in mammary gland tumors of MMTV-cmyc transgenic mice. *Genes Chromosomes Cancer* **25,** 251–260.
47. Wiener, F., Kuschak, T. I., Ohno, S., and Mai, S. (1999) Deregulated expression of c-Myc in a translocation-negative plasmacytoma on extrachromosomal elements that carry IgH and myc genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96,** 13,967–13,972.
48. Ding, H., Roncari, L., Shannon, P., et al. (2001) Astrocyte-specific expression of activated p21-ras results in malignant astrocytoma formation in a transgenic mouse model of human gliomas. *Cancer Res.* **61,** 3826–3836.
49. Mak, T. W., Hakem, A., McPherson, J. P., et al. (2000) Brcal required for T cell lineage development but not TCR loci rearrangement. *Nat. Immunol.* **1,** 77–82.
50. Lefebvre, L., Dionne, N., Karaskova, J., Squire, J. A., and Nagy, A. (2001) Selection for transgene homozygosity in embryonic stem cells results in extensive loss of heterozygosity. *Nat. Genet.* **27,** 257–258.

第 8 章　多色荧光原位杂交

Syed M. Jalal，Mark E. Law

1. 引言

从 1969 年开始，放射性同位素标记的 DNA 或 RNA 就被用作核酸探针[1,2]，20 世纪 80 年代晚期，得到了针对每一条人类染色体的荧光标记涂染探针。Bauman 等（1980）引入可荧光标记的探针，为染色体原位杂交提供了一个很有吸引力的选择[3]。基于每条染色体的独特性序列建立了针对每条染色体的涂染探针[4,5]，Pinkel 等（1988）用 120 个荧光 DNA 探针（FISH）在整个 4 号染色体上进行原位杂交，建立了该染色体特异的涂染探针[6]。20 世纪 90 年代早期，商业上已经可以为人类每条染色体提供两种颜色（绿色和橙色）的全染色体涂染（wcp）探针。Jalal 等阐述了针对每条人类染色体的直接标记 wcp 探针的特征及其临床应用[7]。wcp 探针在染色体分析中作为显带技术的补充，它的出现使分析染色体异常的能力大大增强。

令人真正激动的是，到 1996 年已经可以将人类整个基因组同时涂染，即为每条染色体标记唯一的、明确的颜色[8]，依据惯例，wcp 和多色荧光原位杂交（M-FISH）技术中仍使用过量的未标记互补 DNA 来抑制高度重复 DNA 序列（Cot 1-DNA）。将五种荧光素进行组合标记，设计出特异的颜色组合，从而可以赋予每条人类染色体不同的光谱特征。用这种策略不能标记富含重复 DNA 序列（组成性异染色质）和近端着丝粒短臂区域。Schröck 等[8]指出对光谱核型（SKY）来说，所有发射光的信息都由傅里叶分光术和 CCD 成像，然后每条染色体的光谱特征可在成像软件的辅助下转换成分类颜色[8]，多色光谱核型分析作为诊断和研究工具用于 300 余例的病例中[9]。

也是在 1996 年，另外一种可以替换光谱核型分析的技术建立，这种技术也可使每条染色体呈现独特的、特异的光谱颜色[10]，这种方法也是利用五种荧光素（光谱范围为 350～770nm）的组合标记，在 DAPI 复染的背景下，每条染色体即呈现特定的颜色。与 SKY 利用分光术不同，多色荧光原位杂交（M-FISH）使用一系列有精确（refined）发射光谱的滤光块（见注释 1），这种技术与成像系统结合形成每条染色体特异的荧光图像。M-FISH 是指多色 FISH、多荧光 FISH 或多重 FISH，不过我们更倾向于多色 FISH。M-FISH 的优点在于标准的 FISH 成像系统可非常容易地适用于 M-FISH 分析。美国有 70 多家实验室有某种类型的计算机成像分析系统[11]。Eils 等提出了优化探针标记、成套滤色块和

成像分析以适应 M-FISH 的策略[12]；Law 和 Jalal 也提出了 M-FISH 系统的建立和分析的实用指南[13]。

M-FISH 被成功地用于鉴别先天性疾病中的标记染色体或衍生染色体[14~16]。近来该方法越来越多地被用于确认复杂核型中的多重染色体异常；在进行血液疾病的诊断时，M-FISH 在检测临界染色体重排中非常有用[17]。

1.1 M-FISH 的临床应用

M-FISH 在先天性疾病的组成性染色体异常和血液疾病的获得性染色体畸变分析中都得到了成功运用（见注释 2），尤其需要指出的是 M-FISH 通常可以鉴定未知的标志染色体和衍生染色体，以及确定复杂核型。M-FISH 在检测血液疾病的临界（原发）染色体畸变中起重要作用，尤其当核型较复杂或染色体形态很差时极为有用。然而 M-FISH 在检测微小畸变时还须借助使用位点特异性 DNA 荧光探针。另外一个重要问题就是是否值得使用 M-FISH 检测核型正常的血液疾病样品的染色体结构畸变。我们和 Eastern Cooperative Oncology Group（与 Dr. Dewald 私人交流）的共同经验是：通常这样的检测是无益的，唯一例外的情况是当染色体异常十分微小［如 t（12；21)(p13；q21)］，用染色体显带分析不能分辨出来，或染色体形态极差甚至连大的结构异常都不能分辨出来时。

1.1.1 先天性疾病

在临床细胞遗传学中，一个费力和更有挑战性的工作是全面鉴别标记染色体、衍生染色体或分析复杂核型。据估计在智力障碍个体中，新出现的染色体结构重排的发生率从 0.7/1000 升至 2.4/1000[18]。新出现的超数标志染色体（包括 15 号染色体双卫星标记）的产前频率为 1/2500[19]。几乎所有主要区带与确定的异常表型关联的缺失都以文件形式记录下来[20]。完全相互易位的频率大概是 1/600，平衡易位携带者子代为非平衡染色体组成的风险为 1%～50%[21]。非平衡染色体组合和表型异常广泛关联，据推测罗伯逊易位的发生频率是 1.2/1000，为人群中最常见的染色体异常。Gravholt 等提供的证据表明，在大多数情况下，双臂染色体由位于短臂近着丝粒处的卫星 III DNA 所在位点断裂融合而产生[22]。尽管平衡易位携带者表型正常，但他们后代中具有产生非平衡组合和单亲二倍体的风险[23]。包括多于两条染色体在三处或更多处发生断裂的复杂染色体重排是罕见的异常，据报道在一些含有复杂染色体重排的病例中断裂点能多达 10 处[24,25]。每条染色体的结构异常和数目异常及由此而引起的异常特征已经得到了很好的总结和记录[26,27]。

染色体显带分析是费力的技术，且其详细描述标记染色体、衍生染色体和复杂染色体的能力相当有限。原位杂交和荧光标记 DNA 探针（位点特异性、着丝

粒特异性和染色体特异性）的使用开创了分子细胞遗传学的新纪元。基于中期和间期细胞分析，在产前或产后组织中就可以更详细地描述标记染色体、衍生染色体和复杂核型[7,28～34]。描述这些异常的详细特征和追踪其来源不仅可以充分评价其临床意义，还对基因型与表型的联系、基因作图和遗传咨询具有重要作用。

作为染色体显带分析技术的补充，FISH 相关的着丝粒和位点特异性探针以及 wcp 探针的运用，使详细描述染色体异常能力得到前所未有的发展。尽管如此，在某些情况下这种方法也不足以解决问题，当遇到一个未知来源的标志染色体或新出现的衍生染色体，就会出现应该运用何种类型 FISH 探针的问题。从 20 世纪 90 年代早期就出现了针对每条染色体的商业化涂染探针。基于 α 卫星序列的不同，得到了针对几乎每条染色体（除外 13/21、14/22 和 5/19，这几对染色体之间存在交叉杂交）的探针[5]；而且，也是有限的商业化位点特异性探针。实际在这种情形下，探针的选择是一个不断尝试和犯错误的过程，通常比较耗费时间和金钱。从 1996 年开始，SKY 和 M-FISH 的引入大大解决了这种困难情况，因为这两种技术可以同时使每一条染色体涂染独特的颜色[8,10]。在临床实践中使用 M-FISH（见注释 3 和 4）尤其对下述病例代表的特殊情况十分有效：

病例 1：由于宫内生长迟缓进行羊水染色体分析，在未培养的间期细胞内对 13、18、21、X 和 Y[35]染色体进行非整倍体分析显示正常。对来自 5 个克隆和 4 个原代培养物的 20 个 GTL（G 显带：胰酶消化，Leishman Giemsa 染色）中期染色体分裂相进行核型分析，结果显示为 46，XX，add（15）（q26.1）。用 M-FISH方法确定易位到 15 号染色体新出现的片段来源于 9 号染色体，继而使用 9 号和 15 号 wcp 探针分析得到证实（图 1A，B）。

病例 2：由于孕妇高龄进行羊水染色体分析，对来自 15 个克隆和 3 个原代培养物的 20 个 GTL 中期染色体分裂相进行核型分析，结果显示为 47，XX，+r。经 M-FISH 分析，新出现的环状染色体来自 19 号染色体，并用 19 号 wcp 探针得到证实（图 1C，D）。

病例 3：取 25 周岁孕妇 7.5 孕周时的妊娠物进行成纤维细胞培养，并取该培养物进行染色体分析，20 个 GTL 中期染色体核型分析结果显示 46，XY，add（4）（p12）。对原 G 带细胞（图 1E，F）进行 M-FISH 分析，提示一个片段从 2 号染色体易位至 4 号染色体（见注释 3），并由 2 号 wcp 探针进行了确认。父亲没有进行染色体分析，母亲核型正常。

这 3 个病例均发表在医学遗传学杂志（*Genetics in Medicine*）[14]上。尽管我们实验室对前 25 个病例用 M-FISH 分析后，都接着用 wcp 探针进行证实，但我们还是停止了这种做法，因为我们认为这是不必要的。为了提高效率和了解详细信息，使用 M-FISH 对有些病例所有染色体用荧光同时标记。也有些情况，尽管只是确认比较费力的高分辨显带结果，使用 M-FISH 也非常有效。用图例说明的病例 4～6 可以证实上述情况：

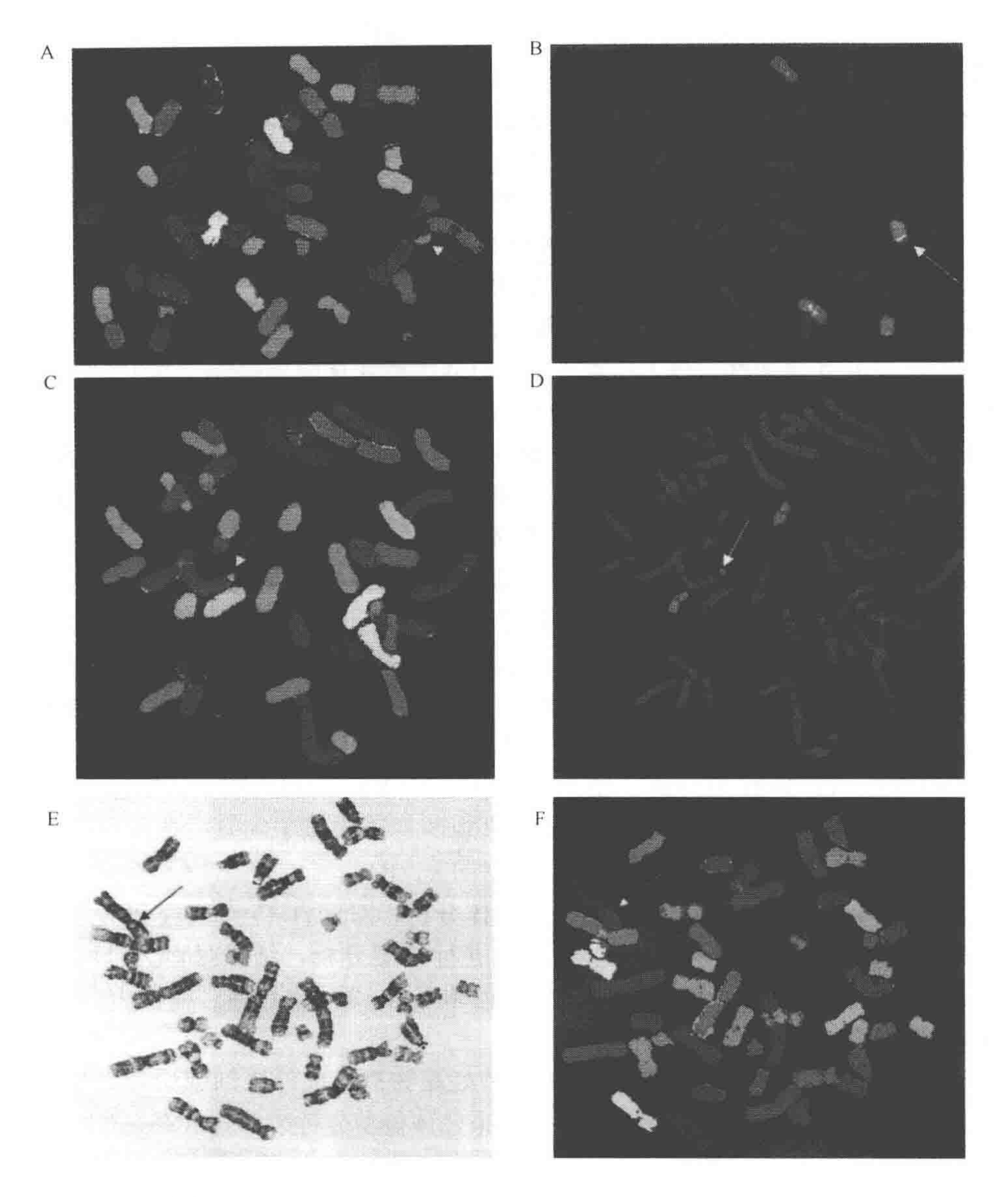


图 1　（A）羊水培养物的 M-FISH 分析得出易位到一条异常 15 号染色体的片段来源于 9 号染色体。（B）通过使用 9 号 wcp 探针证实了 M-FISH 分析结果。（C）羊水培养物的 M-FISH分析得出一个小环状染色体来自 19 号染色体。（D）通过使用 19 号 wcp 探针证实了 M-FISH 分析结果。（E，F）对从自然流产得来的成纤维母细胞培养物依次进行 G 带和 M-FISH 分析得出一个片段从 2 号染色体易位至 4 号染色体（见书后彩图）。

病例 4 和 5：两兄弟有多种异常和认知损害，他们从一个家族性平衡易位遗传了非平衡衍生染色体。其中一个核型为 46,XY,der(4)t(4,8)(p16.1;p23.1),

另一个核型为 46,XY,der(8)t(4,8)(p16.1;p23.1)。要确定这两条衍生染色体中相对微小的断裂点，进行高分辨显带（550～850 条带）需要付出相当大的努力。用 M-FISH 检测到 der(4) 的异常，但在 der(8) 中从 4 号染色体易位来的片段却不能用 M-FISH 或 4 号 wcp 探针检测出来。使用 Wolf-Hirschhorn 关键区域特异性探针对显示这种异常是有帮助的（图 2A，B）。父母没有进行染色体分析。

病例 6：一名有多种异常特征的女婴，其核型为 46,XX,der(7)t(7;12)(q34;p13.1)mat。异常的 7 号染色体存在 7q34-7qer 缺失且 12p13.1-per 重复，这一结果由 M-FISH 联合位点特异性探针证实（图 2C）。

我们已将病例 4、5 和 6 发表在 Mayo Clinic Proceedings[16]上。在所有这些病例中，最有得益的经历是快速确定易位染色体上的片段来源，然而当片段非常微小时，仅使用 M-FISH 是不够的，还必须以位点特异探针为补充来检测和描述异常的特征。

有一个已发表的病例，8q24.1 插入易位至 3p21 用 SKY 方法检测不出，使用 c-myc 基因探针即可检出[36]，这种易位用 M-FISH 也不能检出（我们未发表的结果）。Uhrig 等用 M-FISH 的方法分析了 26 个产前和产后病例的标记染色体、衍生染色体和相互易位[15]。他们得出结论：大部分异常不能用显带分析鉴别出来，但 M-FISH 的方法却能检出。尽管如此，在某些发生缺失或重复的病例中，需用比较基因组杂交或染色体区域特异的多色带型来分析这些异常。

1.1.2 血液疾病

在西方白血病的发病率为 1/25 000。慢性骨髓性白血病（CML）是一种干细胞缺陷，占整个白血病的 1/4，其特征是粒细胞数增多。CML 有已经确定的遗传事件，为观察疾病发生、发展提供了很好的模型。原始细胞遗传学异常是 t(9;22)(q34;q11.2)，原癌基因 C-ABL 易位至位于 22 号染色体的断裂点聚集区（bcr）融合形成费城染色体（Ph）。这种融合产生的嵌合蛋白似乎启动 CML 的发病。如果不进行治疗，慢性期将持续 3 年时间，然后疾病进入加速期，终止于急变期。在更恶性的阶段通常产生继发染色体异常，包括＋8,i(17q)和另外的费城染色体（易位的 22 号染色体）。值得注意的是关键性遗传学 细胞遗传学事件是 t(9;22)(q34;q11.2)的发生，这可由标准中期染色体的细胞遗传学分析进行确认，尤其当含有易位染色体的瘤性克隆所占比例很大时更为重要。这种易位也可用间期 FISH 方法进行检测，这种方法的灵敏度比中期染色体分析要高很多，尤其在用于对骨髓移植和化疗后的残余病灶进行监测时，这种优越性体现得更明显。通过使用荧光标记探针和原位杂交技术，应用单融合和双融合间期 FISH 策略检测这种易位来监测残余病灶[37～39]。

几乎对所有人类肿瘤的非随机性和重复发生的染色体异常都已做了详尽的记

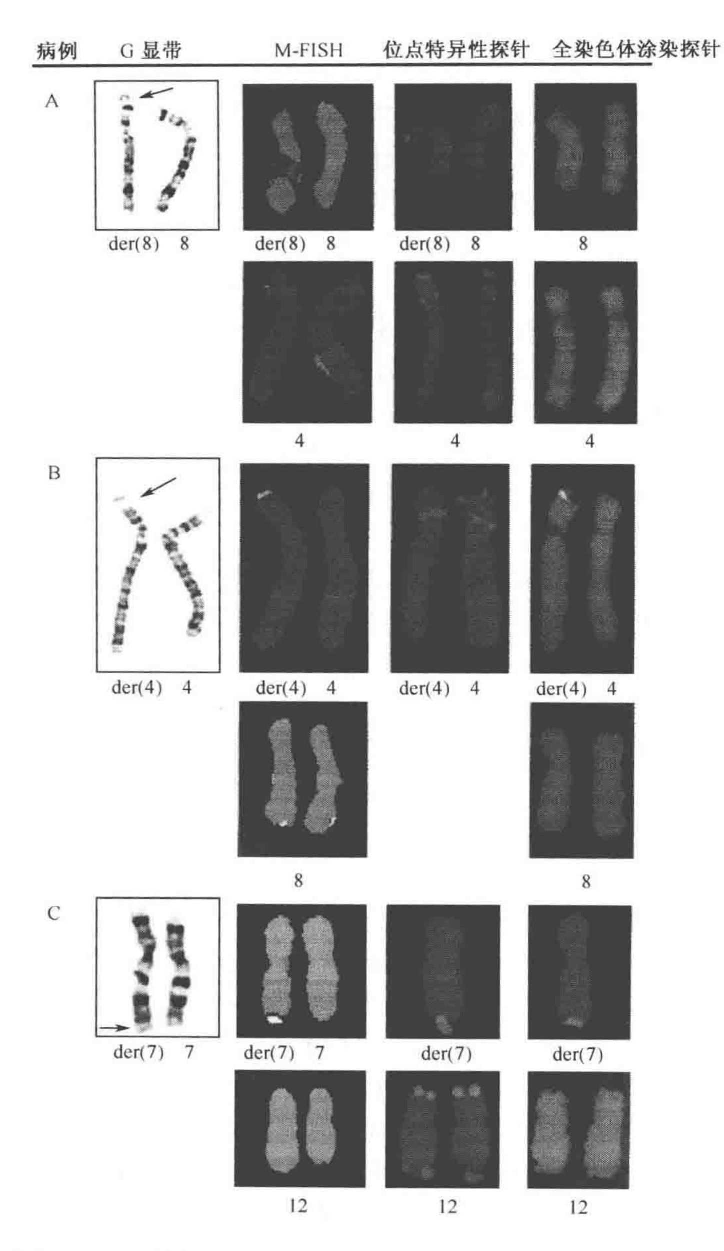


图 2 对两兄弟的全血培养物进行 M-FISH 分析得出两条小的衍生染色体自一条平衡易位染色体 t(4,8)(p16.1;p23.1)分离而来。(A) 使用 4 号 wcp 探针及存在 4p16.3 位点特异探针信号证实了在 der (8) 中的易位片段来自 4 号染色体。(B) 使用 8 号 wcp 探针和不存在 4p16.3 位点特异探针信号证实在 der (4) 中的易位片段来自 8 号染色体。(C) 对核型为 add(7)(q34) 的全血培养物进行 M-FISH 分析得出微小易位片段来自 12 号染色体，并由 12 号 wcp 探针和 12 号染色体短臂端粒特异性探针 FISH 得到证实（见书后彩图）。

录[40]，其中有150多种在血液病中常见的易位、缺失、重复、倒位、等臂染色体和非整倍体等异常[41]。Mitelman等列出了75种肿瘤疾病重复发生的215种平衡和1588种非平衡的染色体畸变[42]，其中排除了非整倍体，因为非整倍体作为原发性染色体异常的作用并不清楚。M-FISH或SKY分析可以鉴别血液病的复杂核型中大部分的染色体异常[9,14]，令人尤其感兴趣的是这样一个问题：在血液疾病中，M-FISH是否能从复杂核型中辨别原发性（临界的）染色体异常。下面是我们发表在英国血液学杂志（*British Journal of Hematology*）病例中的几个示例（图3和图4）。

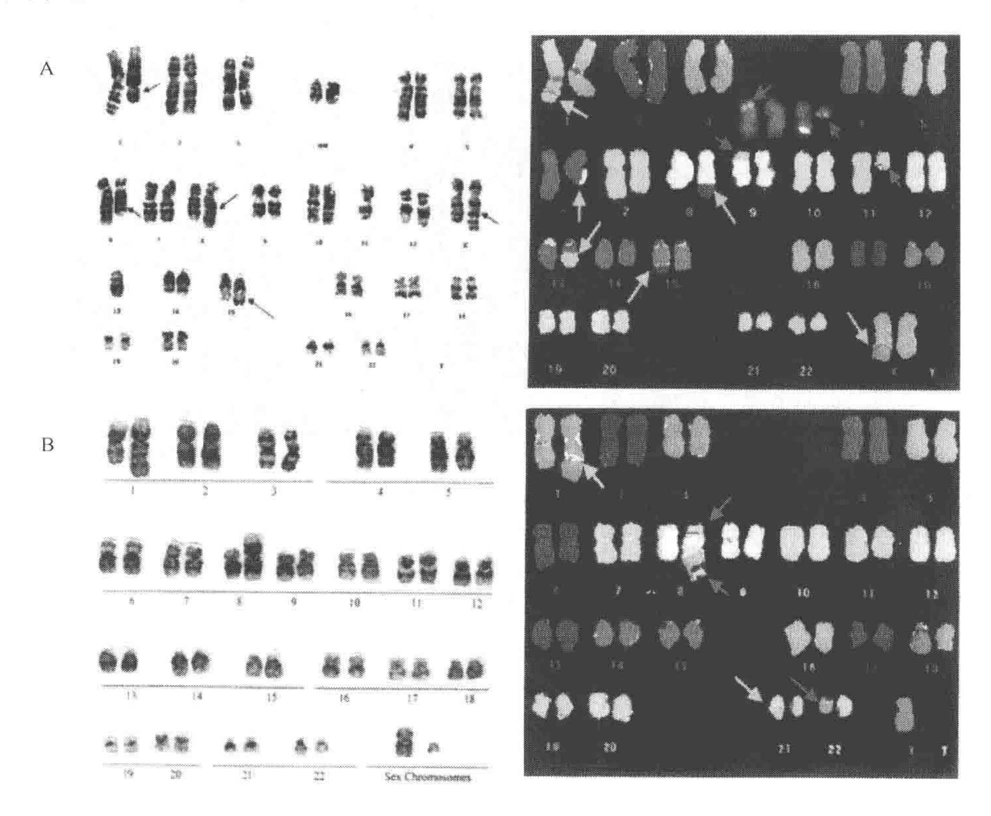


图3　在复杂核型中可进行M-FISH分析以检测关键染色体重排（红箭头标出）和其他的染色体异常（黄箭头标出），这些染色体形态一般较差，大多取自患血液病患者的骨髓样本。(A) 病例1中G带方法未查出的t(9; 11)，用MLL位点重排进行了鉴别和确认；对G带方法查出的t(X;1)，t(6;8)，用M-FISH方法进行了证实并证明两个标记染色体为der(13)t(11;13)和der(15)t(13;15)。(B) 病例2中的关键重排包括add (8)，经M-FISH方法确认为ider(8q)(q10)t(8;22)(q24;q11)，而且，经确认add(1)(q24)为dup(1)，add(14)为der(14)t(3;14)（见书后彩图）。

病例1：诊断为急性骨髓性白血病的1岁女童，G带分析其核型为46，X，

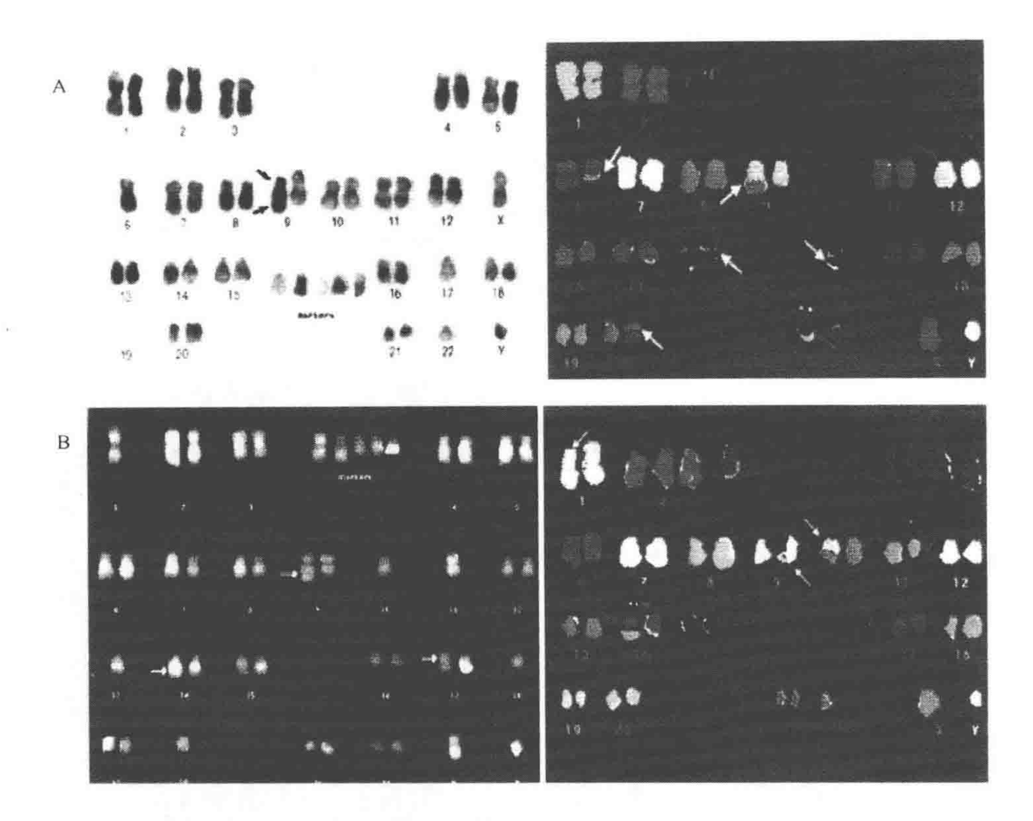


图 4　在复杂核型中可进行 M-FISH 分析以检测关键性染色体重排（红箭头标出）和其他的染色体异常（黄箭头标出），这些染色体形态一般较差，大多为取自患血液病患者的骨髓样本。(A）病例 3 中 G 带方法未查出的 t(12;21)(p13;q21)，用 M-FISH 方法得以鉴别，并由 TEL-AML1 融合进行了证实；对 G 带方法无法确定的 der(6)，add(9)，－17，－19，－19，－22，＋5mar，用 M-FISH 方法进行了确认。(B）病例 4 中 G 带方法未查出的 t(11;14)(q13;q32)，用 M-FISH 方法得以鉴别，并由 cyclin D1 和 IgH 位点融合进行了证实；其他标记染色体被确认为 t(1;9)和 der(10)t(1;10)（见书后彩图）。

t(X;1)(q24;q25),t(6,8)(q25;q24.1),－11,－13,add(15)(q26)＋2 mar[19]/46,XX[1]。M-FISH 分析证实了 t(X;1)和 t(6,8)，且确定标记染色体是 der(13)t(11;13)、add(15)是 der(15)t(13;15)。用 FISH 方法确定了关键性的染色体重排 t(9;11)(p21;q23)，证实了 MLL 基因座重排（图 3A）。患者在诊断 7 个月后因移植并发症而死亡。

病例 2：诊断为急性粒细胞白血病的 38 岁男性，其 G 带核型为 46，XY，add(1)(q42),add(8),add(14)。M-FISH 分析表明 add(1)是 dup(1)，add(14)是 der(14) t(3;14)，add(8)为 ider(8q)(q10) t(8;22)(q24;q11)（图 3B）。t(8;22)的确认对各种 Burkitt 淋巴瘤的诊断相当重要，这种易位使原癌基因 c-myc 易位至免疫球蛋白 λ 轻链基因座附近。

病例 3：患有未明确诊断的血液疾患的 9 岁男孩，对其骨髓样品进行染色体分析，其 G 带核型是：45-47，XY，-6，der(9)add(9)(p13) add(9)(q34)，－17，－19，－19，－22，＋5 mar[cp19]/46,XY[1]，且染色体形态很差。M-FISH分析检测出微小易位 t(12;21)(p13;q21)，通过 FISH 方法确认了 TEL-AML1 融合（图 4A）。t(12；21) 非常微小，对患有 ALL 的儿童进行标准的细胞遗传学分析常常会漏检。M-FISH 也证实了所有剩余的标记染色体像 der(6)、der(9)、der(15)和 der(20)以及两个正常的 19 号染色体。

病例 4：患有未分类的恶性淋巴瘤的 80 岁男性，需进行染色体分析。染色体形态很差，通过 Q 带分析得到的核型为 44-46，XY，－1，add(9)(q34)，－10，－11，－13，add(14)(q32)，add(17)(p11.2)，－18，－20，＋5mar [cp7]/46，XY[3]。M-FISH 分析发现 t(11;14)(q13;q32)，可明确诊断为套细胞淋巴瘤；该易位通过 cyclin D1 和 IgH 基因座融合分析得到了证实。其他标志染色体被确认为 t(1;19)和 der(10)t(1;10)（图 4B）。

2. 材料

1. DAPI 复染液（Vysis，Downers Grove，IL)：－20℃保存，有效期见产品标签。
2. 10%的 DAPI 溶液：将 1 份 DAPI 与 9 份 Vectashield 混合，－20℃保存，6 个月内使用。
3. 70%乙醇：加 300mL 蒸馏水到 700mL 100%乙醇中并混匀，室温保存，一年内使用。
4. 85%乙醇：加 150mL 蒸馏水到 850mL 100%乙醇中并混匀，室温保存，一年内使用。
5. 100%乙醇：纯谷物酒精，室温保存 1000mL 液体，一年内使用。
6. 0.4×SSC（pH 7.0)：将 10mL 20×SSC 与 490mL 蒸馏水混合，室温保存，6 个月内使用。
7. 2×SSC（pH 7.0)：17.53g NaCl、8.82g 柠檬酸钠，加蒸馏水至 1L 或 100mL 20×SSC（pH 6.3）与 900mL 蒸馏水混合，4℃保存，6 个月内使用。
8. 2×SSC/0.1% NP-40：加 1mL NP-40 到 1L 2×SSC 中，室温保存，6 个月内使用。
9. 20×SSC（pH 6.3)：175.3g NaCl、88.2g 柠檬酸钠，加 900mL 去离子水；或加 132g 20×SSC 粉剂（Vysis）于蒸馏水中至终体积为 500mL，用浓盐酸调 pH 为 6.3，室温保存，6 个月内使用。
10. 20×SSC 粉剂（Vysis)：500g 包装，室温保存，有效期见产品标签。
11. 1mol/L 盐酸（Ricca Chemical Company)：32 盎司包装，4℃保存，有

效期见产品标签。

12. 0.01mol/L HCl：加 1mL 盐酸（1mol/L）到 100mL 蒸馏水中，4℃保存，1 年内使用。

13. NP-40（Vysis）：2mL 包装，室温保存，有效期见产品标签。

14. 胰酶（Sigma）：2100U/mg 固体，5g 包装，－20℃保存，有效期见产品标签。

15. 10%胰酶溶液：溶解 1g 胰酶到 10mL 蒸馏水里，4℃保存，3 个月内使用。

16. 胰酶工作液：加 25μL 10%胰酶溶液到 40mL 0.01mol/L HCl 中，2h 内使用。

17. NaCl（Sigma）：500g 包装，3 年内使用。

18. 柠檬酸钠（Sigma）：12kg 包装，室温保存，2 年内使用。

19. Spectra Vysion 探针（Vysis）：50μL 包装，－20℃保存，有效期见产品标签。

20. Vectashield（Vector Laboratories）：4℃保存，有效期见产品标签。

21. M-FISH 探针（见注释 1）。

3. 方法

根据我们的经验[13]和制造商的操作指南，我们采用如下的 M-FISH 方法（见注释 2～4），以及应用该技术的预防措施和常见问题的解决途径（见注释 5～10）。

3.1 染色体标本制备

1. 标本制备：不同标本来源的样品（血液、羊水、成纤维细胞培养物或骨髓）用其相应的标准程序进行制备。

2. 用相差显微镜找到合适的中期染色体分裂相，将杂交区域标记出来。

3. 将标本立在 37℃装有 40mL 胰酶工作液的染色缸中作用 2min。

4. 在一个 HYBrite（Vysis）装置中人工老化片子，90℃、2min。

5. 在 HYBrite（Vysis）装置中用 2×SSC 冲洗片子 2min。

6. 将标本在分别盛有 40mL 70%、85%和 100%乙醇系列的染色缸中室温下依次脱水 1min，风干。

3.2 杂交和洗脱

1. 将 M-FISH 探针混合液（Vysis）加到标记的杂交区域上。

2. 将每张标本的杂交区域上覆以盖片，用橡皮泥在盖片周围封片。

3. 将标本固定在加湿的 HYBrite（Vysis）装置中，设置为：变性温度 80℃，时间为 3min，杂交温度 37℃，杂交时间最少 16h。

4. 将标本在盛有 40mL 0.4×SSC 染色缸中 70℃条件下洗片 1～2min，用流动的去离子水洗片 2s。

5. 将标本移入盛有 40mL 2×SSC/0.1% NP-40 溶液的染色缸中，室温下作用 10s。

6. 每个杂交区域上加 10%的 DAPI 复染液后盖上盖片，注意不要封片。

3.3 分析

1. 使用安装有如下滤光片（见注释 1）的高质量显微镜作为荧光显微镜：①FITC/德克萨斯红/DAPI 三通滤色块以拍摄红、绿和复染光平面。②单通 Gold 滤色块以拍摄 Gold 光平面。③单通 Cy-5 滤色块以拍摄远红光。

2. 分析以 40×物镜 Gold 滤色块开始扫描，选择 Gold 进行扫描有两个原因：颜色明亮且光漂白最少。选好中期分裂相后，图像用 100×物镜进行聚焦，依照制造商的说明拍摄多重照片。抓图软件打开后，要求使用者将阻断滤光片移动到正确的位置以拍摄第一重荧光；第一重曝光后，移动至下一重荧光，曝光。这一过程重复进行，直至分别拍完 5 重荧光和复染 DAPI 的荧光，激发滤色块安装在滤色块轮上并由计算机软件进行控制。任何没有聚焦清晰的图像都必须重新拍摄，然后用计算机软件将所有图像融合为一个图像。根据指定的荧光特征（制造商提供）区分出每条染色体，可立即进行图像分析并排出核型或将图像存储以备以后分析。我们典型的做法是拍摄和分析 5 个中期染色体分裂相，每个病例或克隆排出 2 个核型（图 5A，B）。为了使每个染色体对的荧光特征更显著，必要时可对每个染色体对施以不同的假色，而且每对染色体的假色可以改变。这一特征在强调两条染色体之间重组时尤其有用，因为假色的设定值通常较相似。

4. 注释

1. M-FISH 探针、整套滤色块和计算机软件可作为荧光图像分析系统的附件从几个公司购买得到，我们使用的 M-FISH 系统（Vysis，Downers Grove，IL）使用如下荧光组合，它们的吸收和发射峰（nm）分别为：Far Red(655/675)、Red(592/612)、Gold(530/555)、Green(497/524)、Aqua(433/480)。

2. 用经典的细胞遗传学方法收集细胞，包括先天性（PHA 刺激的血液细胞、羊水细胞、成纤维细胞、绒毛细胞或流产组织）和肿瘤（骨髓、胸膜渗出物或实体瘤）组织。为了染色体铺展和形态的可重复性，我们使用 Thermatron 干

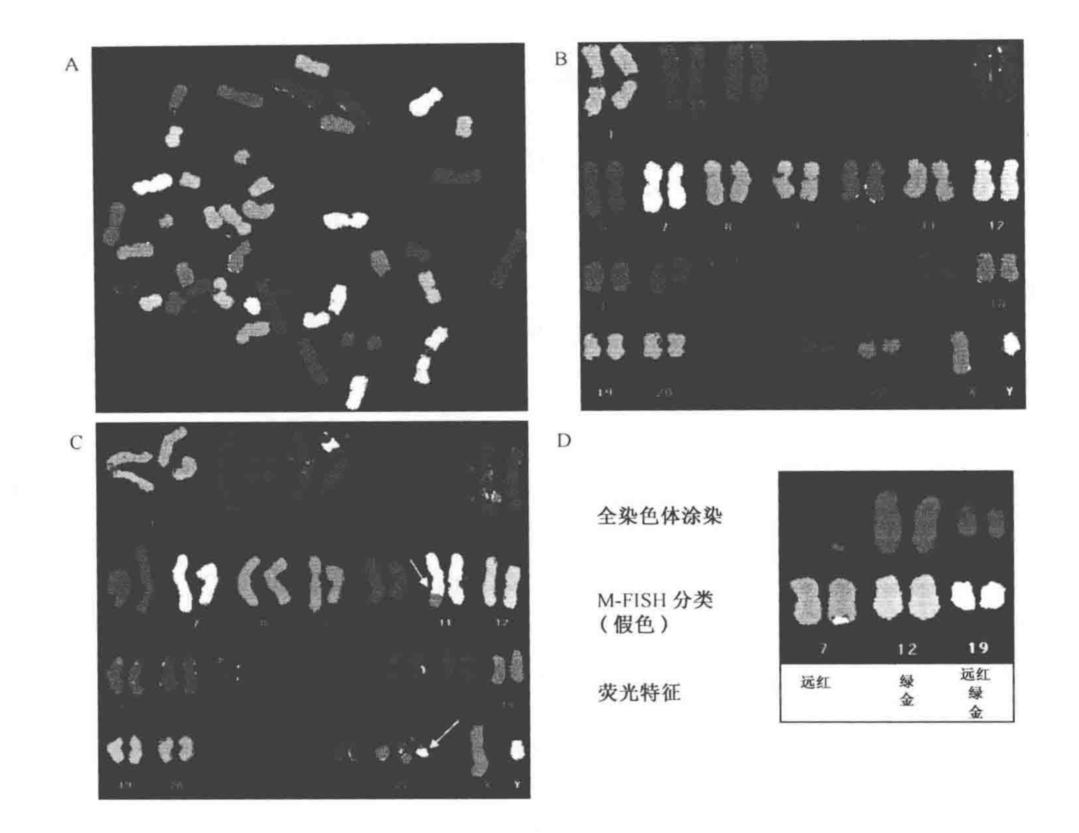


图 5 （A，B）对 PHA 刺激的全血培养物进行 M-FISH 分析，显示了中期染色体分裂相和正常男性的核型。（C）对成纤维细胞培养物进行 M-FISH 分析显示 t(11;22)和额外的 22 号染色体。黄箭头标示出易位，红箭头标示出染色体重叠区域。（D）对携带 7 号和 12 号染色体非平衡易位的全血培养物进行 M-FISH 分析，发现易位到 7 号染色体的片段由于信号重叠的原因看似来源于 19 号染色体，但单独使用 12 号 wcp 探针发现该片段实际上来源于 12 号染色体（见书后彩图）。

燥小室进行收获，用该装置进行血液细胞收获时最佳设置为 25℃，相对湿度 50％。在这种设置下，将一滴固定好的细胞悬液滴在一个置于干燥小室的干载玻片上。不同组织需要不同的设置，有时由于环境温度和湿度不同设置也需调整。最好在相差显微镜下检查所滴第一张玻片，看是分散不够还是过度分散，从而相应调整温度和湿度的设置。

3. 像将 wcp 探针杂交于显带的染色体上一样[14]，我们成功地在 G 显带后进行 M-FISH 分析。这种相继染色必须小心进行才能得到理想的结果，用二甲苯除去镜油（我们不使用盖片）后，G 显带标本置于通风橱中晾干。G 显带的过程包括：90℃人工老化 1h、胰酶消化和 Leishman Giemsa 染色。去掉镜油后，将标本在 3∶1 的甲醇∶冰乙酸固定液中脱色 10～15s，风干。标本用 2×SSC 37℃

处理 5～15min，然后在 1%甲醛（甲醛/PBS，pH 7.4）中室温浸泡 5min、PBS（磷酸平衡缓冲液，pH 7.4）中室温浸泡 5min，系列乙醇（70%、85%和 100%）中各脱水 1min，杂交步骤和杂交洗脱步骤前面已经列出。

4. 不论新鲜制备的标本还是标本显带后相继 M-FISH，将 M-FISH 的探针（Vysis，Downer Grove，IL）加到杂交区域上，盖上盖玻片并用橡皮泥封片，然后将玻片放入湿的 Hybrite 中，其设置如下：解链温度 80℃、3min，杂交温度 37℃，至少 16h。通常新鲜制备的标本 M-FISH 杂交结果较好，因为 G 带通常要进行人工老化。

5. 进行 M-FISH 分析时需要考虑的很重要的一点是：靶位点杂交和非特异结合的对比度。如果对比度较差，染色体分类颜色也将会不显著，对比度对远红外荧光尤其重要。加长胰酶处理时间有助于提高对比度，而处理时间过长将会导致染色体 DNA 和信号丢失，从而使染色体颜色暗淡。杂交盒湿度不够将会使杂交试剂脱水浓缩，这将会导致探针和染色体 DNA 随机杂交（松散结合），从而使对比度下降。

6. 获得理想结果的另一个重要因素是染色体形态。染色体形态不好将使 DAPI 带型转化为灰度时很难解释，也可导致染色体颜色从一条染色体流入另一条染色体。导致染色体形态不好的最常见原因是老化不充分，人工老化或将片子用热的 2×SSC 处理 2min 有助于改善染色体形态。通常用去离子水室温下冲洗标本继以 DAPI 复染也可以改善带型，但会降低杂交强度。增加老化或加长 2×SSC 预处理时间也会减少杂交强度。染色体形态不好也可能由过度变性引起。染色体形态很好但杂交效果很差通常提示标本过度老化、过久的 2×SSC 处理或变性不足。制备的标本较脏，玻片上留有较多的背景残片也会使结果受到不好的影响。明亮的荧光残片将使曝光时间缩短，影响染色体分类，用德克萨斯红时这种现象尤为明显。在人工操作模式下，加长标本的德克萨斯红平面曝光时间可使这个问题得以解决。

7. 有时即使经过最大的努力，试剂或程序完全正确还是很难得到最理想的结果。这时就需要分别观察每个光平面，将之与制造商提供的表对比。例如，22 号染色体（浅绿、红、绿）有时会被错划为 3 号（浅绿）染色体，可以分别观察红、绿光平面来确定这两种光谱是否存在，从而确定所观察染色体是不是 22 号染色体。

8. 在染色体间相互易位和染色体重叠中，由于荧光素相互重叠，断裂和融合的交界处进行染色体区分时常常提示有第三条染色体或该区域变成灰色（图 5C）。当易位片段很小时上述情况就很重要，根据观察到的颜色分类，将所有可能的染色体都考虑进来。例如，一个衍生的 7 号染色体从 12 号染色体上易位来一个片段，可能会被划为 19 号染色质（图 5D），因为 7 号染色体的标记为远红外（far red），12 号为金黄色和绿色（gold and green），因此三种颜色组合（远

红外、金黄色和绿色）正好是19号染色体的特征。因此要解决这个问题，我们必须用12号染色体wcp探针对样品进行分析，结果阳性可断定易位片段来源为12号染色体，结果阴性则可断定片段来源为19号染色体。当荧光组合超出分类系统的范围也会显示为灰色区域，例如，20号（远红外、浅绿色和红色）和21（金黄色和浅绿色）号染色体重叠结果产生一个4种颜色的组合（远红外、浅绿色、红色和金黄色），就会出现一个灰色区域，因为没有哪条染色体的颜色组合多于3种，图5的示例摘自我们在 *Journal of Association of Genetic Technologists* 上发表的文章。

9. 当衍生染色体的荧光光谱包含易位染色体的所有荧光素特征时，小的易位，特别是插入尤其容易被错读。举个例子，当1号染色体（金黄色）的小片段易位至5号染色体（金黄色和远红外），整条染色体看起来还像是5号染色体，单独使用1号染色体涂染探针就可以解决此问题。

10. 组成性异染色质，包括富含α卫星的片段和富含重复DNA序列的近端着丝粒短臂，可以用未标记的Cot 1-DNA封闭掉或探针中不包含其互补序列。这些区域也变成灰色或随机施以假色并进行分类（图5C），在分析标记染色体或衍生染色体时必须谨记此现象。M-FISH的其他一些局限包括：不能检测大多数的染色体内异常（如倒位）和不大于3Mb的染色体间异常。

（马　芬 译，刘青杰 校）

参考文献

1. Gall, J. G. and Pardue, M. L. (1969) Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **63,** 378–383.
2. John, H. A., Birnstiel, M. L., and Jones, K. W. (1969) RNA-DNA hybrids at the cytological level. *Nature* **223,** 582–587.
3. Bauman, J. G. J., Wiegant, J., Borst, P., and van Duijn, P. (1980) A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by *in situ* hybridization of fluorochrome-labeled RNA. *Exp. Cell Res.* **128,** 485–490.
4. Pinkel, D., Straume, T., and Gray, J. W. (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83,** 2934–2938.
5. Tkachuk, D. C., Pinkel, D., Kuo, W.-L., Weier, H.-U., and Gray, J. W. (1991) Clinical applications of fluorescence *in situ* hybridization. *GATA* **8,** 67–74.
6. Pinkel, D., Landegent, J., Collins, C., et al. (1988) Fluorescence *in situ* hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85,** 9138–9142.
7. Jalal, S. M., Law, M. E., and Dewald, G. W. (1996) Atlas of whole chromosome paint probes: normal patterns and utility for abnormal cases. *Mayo Foundation*, 145 pages.
8. Schröck, E., du Manoir, S., Veldman, T., et al. (1996) Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* **273,** 494–497.
9. Knutsen, T. and Ried, T. (2000) SKY: a comprehensive diagnostic and research tool. A review of the first 300 published cases. *J. Assoc. Genet. Tech.* **26,** 3–15.
10. Speicher, M. R., Ballard, S. G., and Ward, D. C. (1996) Karyotyping human chromosomes

by combinatorial multi-fluor FISH. *Nat. Genet.* **12,** 368–375.

11. Schwartz, S. (1999) Molecular cytogenetics: show me the color. *Genet. Med.* **1,** 178–180.
12. Eils, R., Uhrig, S., Saracoglu, K., et al. (1998) An optimized, fully automated system for fast and accurate identification of chromosome rearrangements by multiplex-FISH (M-FISH). *Cytogenet. Cell Genet.* **82,** 160–171.
13. Law, M. and Jalal, S. M. (2000) M-FISH technique: how to set up and analyze. *J. Assoc. Genet. Tech.* **26,** 51–53.
14. Jalal, S. M. and Law, M. E. (1999) Utility of multicolor fluorescent *in situ* hybridization in clinical cytogenetics. *Genet. Med.* **1,** 181–186.
15. Uhrig, S., Schuffenhauer, S., Fauth, C., et al. (1999) Multiplex-FISH for pre- and postnatal diagnostic applications. *Am. J. Hum. Genet.* **65,** 448–462.
16. Jalal, S. M., Law, M. E., Lindor, N. M., Thompson, K. J., and Sekon, G. S. (2001) Application of M-FISH for enhanced characterization of chromosome abnormalities in congenital disorders. *Mayo Clinic Proc.* **76,** 16–21.
17. Jalal, S. M., Law, M. E., Stamberg, J., et al. (2001) Detection of diagnostically critical, often hidden, anomalies in complex karyotypes of hematologic disorders by multicolor FISH. *Brit. Jour. Hemat.* **112(4),** 975–979.
18. Warburton, D. (1982) De novo structural rearrangements; implications for prenatal diagnosis in *Problems in diagnosis and counseling.* (Wiley, A. M., Carter, J. P., Kelly, S., and Porter, I. H., ed.), New York: Academic Press, pp. 63–75.
19. Warburton, D. (1991) De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes. Identified at prenatal diagnosis: Clinical significance and distribution of breakpoints. *Am. J. Hum. Genet.* **49,** 995–1013.
20. Brewer, C., Holloway, S., Zawalnyski, P., Schinzel, A., and Fitzpatrick, D. (1998) A chromosomal deletion map of human malformations. *Am. J. Hum. Genet.* **63,** 1153–1159.
21. Daniel, A., Hook, E. B., and Wulf, G. (1989) Risks of unbalanced progeny at amniocentesis to carriers of chromosome rearrangements: data from United States and Canadian laboratories. *Am. J. Med. Genet.* **31,** 14–53.
22. Gravholt, C. H., Friedrich, U., Caprani, M., and Jorgensen, A. L. (1992) Breakpoints in Robertsonian translocations are localized to satellite III DNA by fluorescence *in situ* hybridization. *Genomics* **14,** 924–930.
23. Wang, J.-C., Passage, M. B., Yen, P. H., Shapiro, L. J., and Mohandas, T. K. (1991) Uniparental heterodisomy for chromosome 14 in a phenotypically abnormal familial balanced 13/14 Robertsonian translocation carrier. *Am. J. Hum. Genet.* **48,** 1069–1074.
24. Kousseff, B. G., Nichols, P., Essig, Y.-P., Miller, K., Weiss, A., and Tedesco, T. A. (1987) Complex chromosome rearrangements and congenital anomalies. *Am. J. Med. Genet.* **26,** 771–772.
25. Tupler, R., Maraschio, P., Gerardo, A., Mainieri, R., Lanzi, G., and Tiepolo, L. (1992) A complex chromosome rearrangement with 10 breakpoints: tentative assignment of the locus for Williams syndrome to 4q33-35.1. *J. Med. Genet.* **29,** 253–255.
26. Schinzel, A. (1984) *Catalogue of unbalanced chromosome aberrations. deGruyter.*
27. Borgaonkar, D. S. (1993) *Chromosomal variation in man.* 7th Ed. Wiley-Liss.
28. Brondum-Nielsen, K. and Mikkelsen, M. A. (1995) A 10-year survey, 1980–1990, of prenatally diagnosed small supernumerary marker chromosomes, identified by FISH analysis. Outcome and follow-up of 14 cases diagnosed in a series of 12,699 prenatal samples. *Prenat. Diagn.* **15,** 615–619.
29. Callen, D. F., Eyre, H., Yip, M. Y., Freemantle, J., and Haan, E. A. (1992) Molecular cytogenetic and clinical studies of 42 patients with marker chromosomes. *Am. J. Med.*

Genet. **43,** 709–715.
30. Crolla, J. A., Long, F., Rivera, H., and Dennis, N. R. (1998) FISH and molecular study of autosomal supernumerary marker chromosomes excluding those derived from chromosome 15 and 22, I. Results of 26 new cases. *Am. J. Med. Genet.* **75,** 355–366.
31. Crolla, J. A. (1998) FISH and molecular studies of autosomal supernumerary marker chromosomes excluding those derived from chromosome 15, II. Review of literature. *Am. J. Med. Genet.* **75,** 367–381.
32. Schwartz, S., Depinet, T. W., Leana-Cox, J., et al. (1997) Sex chromosome markers: characterization using fluorescence *in situ* hybridization and review of literature. *Am. J. Med. Genet.* **71,** 1–7.
33. Vierbach, R., Engels, H., Gamerdinger, U., and Hansmann, M. (1998) Delineation of supernumerary marker chromosomes in 38 patients. *Am. J. Med. Genet.* **76,** 351–359.
34. Babovic-Vuksanovic, D., Michels, V. V., Law, M. E., et al. (1999) Guidelines for buccal smear collection in breast-fed infants. *Am. J. Med. Genet.* **84,** 357–360.
35. Jalal, S. M., Law, M. E., Carlson, R. A., and Dewald, G. W. (1998) Prenatal detection of aneuploidy by directly labeled multicolor probes and interphase fluorescence *in situ* hybridization. *Mayo Clinic Proc.* **73,** 132–137.
36. Schröck, E., Veldman, T., Padilla-Nash, H., et al. (1997) Spectral karyotyping refines cytogenetic diagnostics of constitutional chromosomal abnormalities. *Hum. Genet.* **101,** 255–262.
37. Dewald, G. W., Schad, C. R., Christensen, E. R., et al. (1993) The application of fluorescent *in situ* hybridization to detect Mbcr/abl fusion in variant pH chromosomes in CML and ALL. *Cancer Genet. Cytogenet.* **71,** 7.
38. Dewald, G. W., Wyatt, W. A., Juneau, A. L., et al. (1998) Highly sensitive fluorescence *in situ* hybridization method to detect double BCR/ABL fusion and monitor response to therapy in chronic myeloid leukemia. *Blood* **91(9),** 3357–3365.
39. Buno, I., Wyatt, W. A., Zinsmeister, A. R., Dietz-Band, J., Silver, R. T., and Dewald, G. W. (1998) A special fluorescent *in situ* hybridization technique to study peripheral blood and assess the effectiveness of interferon therapy in chronic myeloid leukemia. *Blood* **92(7),** 2315–2321.
40. Mitelman, F. (1994) Catalogue of chromosome aberrations in cancer. 5th Ed. Wiley-Liss, New York.
41. Dewald, G. W. and Stupca, P. (2000) 154 chromosome anomalies in hematologic malignancies. *Leuk. Res.* **24,** 487–489.
42. Mitelman, F., Mertino, F., and Johansson, B. (1997) A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia. *Nat. Genet. Special Issue*, 417–474.

第9章　用比较基因组杂交描述染色体结构异常

Brynn Levy，Kurt Hirschhorn

1. 引言

比较基因组杂交（CGH）是一种能够在一步全基因组筛查程序，描述G带不能发现的细胞遗传物质增加或减少的分子细胞遗传学技术。CGH优于进行全染色体涂染（wcp）的常规荧光原位杂交（FISH）和多色FISH之处，是它不仅能够识别增加的未知片段的染色体来源，而且还可将该片段定位于特定的染色体区带。采用各种探针进行FISH来确定增加的染色体片段的来源，这个过程昂贵且费力，因为在识别出染色体来源之前，可能需要多种wcp探针。另外，能够得到的位点特异性探针的数量也有限，仅能覆盖基因组的一部分。

到目前为止，关于CGH的研究报道超过1100篇，其中大约90%的文献是探索CGH在描述肿瘤标本细胞遗传学改变中的作用。大约6%的CGH文献涉及技术方面，只有有限几篇文献阐述了CGH在临床细胞遗传学分析中的应用。因为易于对染色体内部的扩增、缺失、不平衡易位和标记染色体（包括新着丝粒标记染色体）进行识别和特征描述，CGH在临床细胞遗传学中发挥着特殊作用[1~4]。除了鉴定增加/缺少的染色体片段的来源外，CGH也能够将该片段所在的染色体位置定位到特异的G带上。CGH分析软件是许多FISH成像系统的选择性附加软件，不需要添加专门的设备。随着许多综合性细胞遗传实验室配备常规细胞遗传和FISH分析用的图像分析设备，CGH作为一种临床细胞遗传学工具的应用将可能越来越多。除了识别不能被G带识别的染色体片段的扩增或缺失外，CGH也能够用作细胞培养失败样本的非整倍性分析的候补方法。在分析无法成活的妊娠胎儿组织发生染色体异常（据估计约50%，主要为非整倍体）的过程中，CGH也将发挥尤其特殊的作用[5]。

CGH是1992年由Kallioniemi等建立的用于在肿瘤细胞系和早期膀胱肿瘤中鉴定16种前所未知的扩增区域。CGH能有效检测出特定样本中的任何DNA序列拷贝数的变化（增加、扩增或缺失），并在正常染色体上定位该区域[6~9]，该方法能够检测到30%～50%或更多样本细胞中的变化[9]，但不能发现平衡易位、倒位和其他不引起拷贝数改变的染色体异常。CGH是利用不同标记的全基因组待检DNA和正常参考DNA，同时与正常人中期染色体标本片进行原位杂

交[6~9]，杂交的待检 DNA 和参考 DNA 可以根据不同的荧光颜色分辨出来。特定染色体区域上杂交的待检和参考 DNA 的相对数量是依赖于两种标本 DNA 中该序列的相对量，并可以通过计算其不同荧光颜色的比率而定量[6~9]。待检 DNA 通常标记绿色荧光如 FITC，而正常参考 DNA 通常标记红色荧光如德克萨斯红。待检样本中染色体物质的增加可以通过绿/红比率的增加而检测到，而缺失可以通过绿/红比率的降低而检测到[6~9]。

1.1 CGH 在临床细胞遗传学中的敏感性

CGH 的敏感性是受到广泛关注的问题。理论上，CGH 能够检测的最小缺失估计在 2Mb 左右（Piper 1995）。采用我们建立的 CGH 标准实验方法，能够检测到 3～6Mb 大小的缺失、扩增和标记染色体。传统的细胞遗传学分析方法能够检测到不平衡性染色体异常的范围是：400 条带水平为 5～10Mb、1000 条带水平为 2～3Mb。因此，CGH 检测缺失的限值似乎与标准 G 带染色体观察的水平有关。例如，如果常规的细胞遗传学分析时没有发现明显的不平衡性染色体异常，CGH 分析也不可能提供额外的“核型”信息。

1.1.1 疑为倒位病例的 CGH 分析

CGH 和 FISH 两种方法相结合能够有效解决在特定衍生染色体中观察到的一个异常带型，究竟是小片段重复还是微小倒位的结果。在这种情况下，必须进行 wcp 来证实该衍生染色体不含有来自其他染色体的片段。如果染色体涂染的结果完整均一，那么正常的 CGH 结果说明该染色体很可能发生倒位。一些病例中，断裂点可以通过 GTG 图像分析证实。然而，应该进一步用分子细胞遗传学分析确定断裂点。很明显，染色体 CGH 的绿/红比率的增加将证实扩增的存在。

1.1.2 表观平衡易位的临床异常病例的 CGH 分析

在临床表现提示的染色体病因是平衡易位的病例中，进行 CGH 分析有可能发现断裂点位置的微小不平衡（图 1）。当 CGH 结果显示所有染色体的绿/红比率都正常时，易位是真正平衡的；但患者的临床表型仍然有可能是微小缺失或断裂点区域的关键基因损伤造成的。

1.1.3 正常染色体核型的临床异常病例的 CGH 分析

只有当患者的临床表现强烈提示存在染色体异常时，才采用 CGH 方法对正常核型的病例进行分析以寻找不平衡易位。CGH 分析仅对那些罕见病例有效，这些病例发生染色质的不等交换，但带型几乎不改变造成核型正常的假象。当 CGH 和 GTG 结果都正常时，患者表型的病因可能源于其他的遗传和（或）环

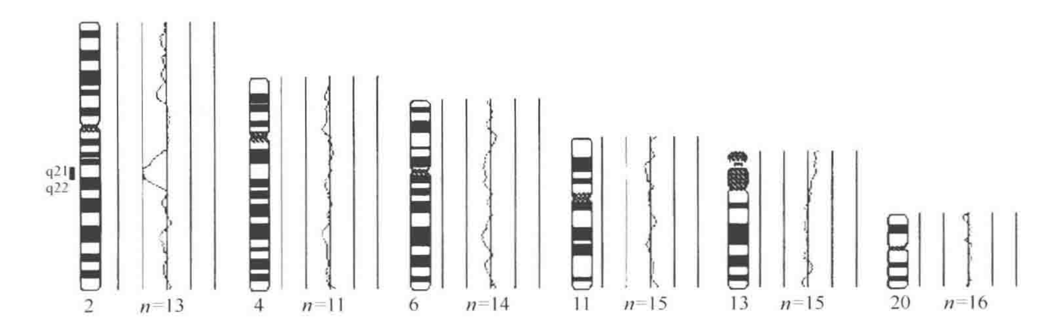


图 1 用 CGH 分析一个表观平衡易位的患者，发现一个 2q21-q22 的小片段中间缺失。

境因素。对于这样的病例，CGH 结果正常也可以用 CGH 本身的局限性来解释，例如，正常的 CGH 结果不能排除微小平衡性染色体重排的可能性，也不能排除亚显微不平衡性染色体异常，如微小缺失的可能性。

1.2 与 GTG 核型共分析

尽管 CGH 结果为核型分析提供了有价值的信息，GTG 图像仍然是修正核型的重要因素。在图 2 中识别一个三体区域不能仅仅依靠 CGH，还需要与过度表达区域的 GTG 图像相结合。一些病例中，用 CGH 方法描述含有标记染色体和复制的特异区域，对增加的染色体物质可以采用 GTG 图像分析确定其位置，不需要进一步的分子细胞遗传学研究。

1.3 CGH 操作程序要点

CGH 的主要步骤包括：

1. 制备正常 46，XY 核型的中期染色体标本。

2. 从患者（待检）样本和正常人（参考）样本中提取高分子质量 DNA。

3. 用不同荧光染料通过缺口平移方法标记患者 DNA 和参考 DNA。

4. 等量的标记好的待检 DNA 和参考 DNA 与未标记的 Cot 1-DNA 一起，与正常中期染色体标本进行原位杂交。

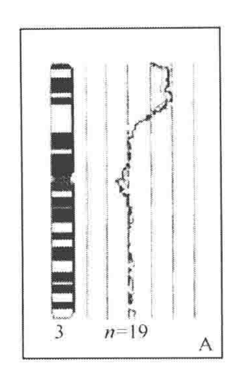
5. 洗脱未结合的 DNA。

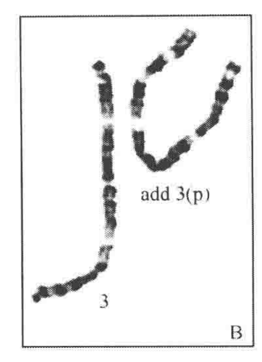
6. 用 DAPI 复染中期染色体标本以识别各染色体。

7. 用装有荧光特异性滤光片的荧光显微镜，观察沿着染色体的色彩比率的变化，并拍照。

8. 根据 DAPI 反转带型识别各条染色体。

9. 通过沿着各对染色体的待检 DNA 和参考 DNA 荧光强度比率曲线，定量





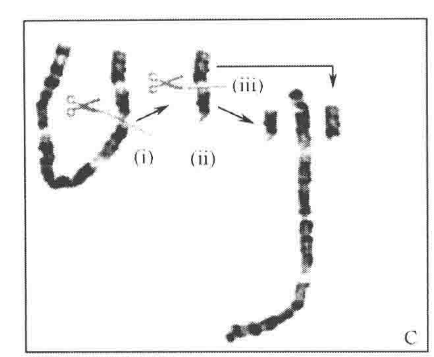


图 2　结合 CGH 结果和 GTG 图像鉴定一个三体区域。(A) 3 号染色体的 CGH 平均比率曲线在 3p21.33-3p25.3 区域发生显著的过度表达，置信区间为 95%。(B) G 带结果显示正常的 3 号染色体和 3p 增加的染色体。(C) (i) 从衍生染色体上数字化剪切下增加的染色体区域。(ii) 和 (iii) 将增加的染色体区域（数字化分离的）和正常 3 号染色体的 3p25.2-3p21.33 区域排列在一起。

拷贝数的改变。

10. 将多个中期染色体标本的荧光强度比率曲线进行综合，提高结果的意义。

2. 材料

2.1 正常男性外周血培养

1. 抽取核型正常男性的外周血（约 10mL）加到肝素管中，室温保存（不能冷冻），如果需要可以在 4℃保存过夜（见注释 1）。

2. 新鲜配制的固定液（甲醇：冰乙酸＝3：1）。

3. 10μg/mL KaryoMAX 秋水仙胺（Gibco-BRL；Life Technologies；Grand Island NY）。

4. 秋水仙胺工作液：用灭菌蒸馏水 1：1 溶解 KaryoMAX 秋水仙胺（4℃保存）。

5. 1×RPMI 1640 培基（含 L-谷氨酰胺）(Cellgro；Mediatech Inc.，Herndon VA)。

6. 胎牛血清（Irvine Scientific，Santa Ana CA）。

7. 青霉素（10 000U/mL）、链霉素（10 000μg/mL）(Gibco-BRL；Life Technologies；Grand Island NY)。

8. L-谷氨酰胺（200mmol/L）（Gibco-BRL；Life Technologies；Grand Is-

land NY)。

9. 植物血球凝集素（45mg)(Irvine Scientific，Santa Ana CA)：溶于4.5mL无菌蒸馏水配制成10mg/mL的储存液（4℃保存）。

10. HEPES缓冲液（1mol/L）（Gibco-BRL；Life Technologies；Grand Island NY)。

11. 0.075mol/L KCl。室温保存，使用前37℃预热。

12. 1×Dulbecco磷酸缓冲液（PBS）（Cellgro；Mediatech Inc.，Herndon VA)。

13. 用PBS配制的胸苷溶液（15mg/mL)，分装后−20℃保存。

14. 启动培养基（100mL)：86mL含L-谷氨酰胺的RPMI 1640、10mL胎牛血清、1mL青链霉素、1mL L-谷氨酰胺和2mL植物血球凝集素。

15. 连续培养基（100mL)：87mL含L-谷氨酰胺RPMI 1640、10mL胎牛血清、1mL青链霉素、1mL L-谷氨酰胺和1mL HEPES缓冲液。

16. 巴斯德吸管。

2.2 正常男性中期染色体标本的制备

1. 预先擦干净的玻璃载玻片。

2. 新鲜配制的固定液（甲醇：冰乙酸=3：1)。

3. 染色缸。

4. 1×Dulbecco磷酸缓冲液（PBS）（Cellgro；Mediatech Inc.，Herndon VA)。

5. 1%福尔马林后固定液：1.35mL 37%福尔马林和48.65mL PBS，4℃保存，1个月内使用。

6. 系列乙醇：70%、85%和100%乙醇。室温储存，如果每天使用可以重复使用一周。如果一周内使用1或2次，可以反复使用4周以上。

2.3 从患者和正常样本中提取高分子质量DNA

1. 将患者血（≥3mL）加入到含有EDTA或肝素钠的管中，室温保存（见注释2)。

2. 将与患者性别相同的正常对照人血（≥10mL）加入到含有EDTA或肝素钠的管中，室温保存（见注释3)。

3. PureGene DNA纯化试剂盒（Gentra Systems，Minneapolis，MN)。

2.4 用缺口平移法标记探针

1. 浓缩 DNA（0.2～1.5μg/μL），每次标记 1μg DNA。

2. 冰盒或 15℃水浴锅。

3. 72℃水浴锅。

4. 荧光素-2-dUTP（1mmol/L）（Perkin Elmer Life Science NEM，Boston MA），－20℃保存。

5. 德克萨斯红-5-dUTP（1mmol/L）（Perkin Elmer Life Science NEM，Boston MA），－20℃保存。

6. 整套 dNTP（dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 100mmol/L）（Life Technologies；Grand Island NY）。

7. 14.3mol/L 的 2-巯基乙醇（Sigma，St. Louis MO）。

8. 牛血清白蛋白（20mg/mL）(Sigma，St. Louis MO）。

9. dNTP 混合物：0.2mmol/L dATP、0.2mmol/L dCTP、0.2mmol/L dGTP、0.03mmol/L dTTP、500mmol/L Tris pH7.5、50mmol/L $MgCl_2$、100mmol/L 2-巯基乙醇和 100μg/mL 牛血清白蛋白，－20℃保存。

10. 无 RNA 酶的 DNA 酶（1U/μL）（Promega，Madison，WI），－20℃保存。

11. 无 RNA 酶的 DNA 酶（各种浓度，0.01～0.1U/μL）（Promega，Madison，WI），用冷蒸馏水溶解 DNA 酶，新鲜配制，用后扔掉（见注释 4）。

12. 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I（10U/μL）（New England Biolabs，Inc.，Beverly MA），－20℃保存。

13. 10×反应缓冲液混合物（与大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 一起提供）：100mmol/L Tris-HCl、50mmol/L $MgCl_2$ 和 75mmol/L 二硫苏糖醇，－20℃保存。

14. 50×TAE：242g Tris 碱、57.1mL 冰乙酸、100mL 0.5mmol/L EDTA（pH8.0），加水定容至 1L，室温保存。

15. 1×TAE：10mL 50×TAE、490mL H_2O。室温保存。

16. 1%溶液溴化乙锭（EB）（Fisher Scientific，Fair Lawn NJ）。

17. 含 EB 的电泳缓冲液：10mL 50×TAE、490mL H_2O、25μL 1% EB 溶液。EB 是致癌剂和致突变剂，配制溶液时应戴手套操作，丢弃时应作为危险废弃物。在包有铝箔的有盖容器中室温避光保存，可以重复使用 6～8 次。

18. 1%琼脂糖凝胶：1g 琼脂糖溶于 100mL 1×TAE 溶液中，现用现配。

19. 微型凝胶系统和电源。

20. 紫外透射反射仪、紫外防护面罩和护目镜。

21. 一次标记反应可以大批量进行，标记超过 1μg DNA（见注释 5）。

2.5 CGH 探针的制备

1. 用缺口平移法标记的患者 DNA（200ng）和参考 DNA（200ng）。

2. 人 Cot 1-DNA（1μg/μL）(Gibco-BRL；Life Technologies；Grand Island NY)。

3. 3mol/L 乙酸钠：溶解 408.1g 三水合乙酸钠于 800mL 水中，用冰乙酸调 pH 到 5.2，加水定容至 1L。

4. 100%冰冷乙醇：−20℃保存，使用前取出。

5. 有棉花尖头的涂布器（Citmed，Citronelle AL)。

6. 设置温度为 42℃的玻片电热板。

7. 可以放置 1.5mL 离心管的金属架或 PCR 架。将其放在电热板上，则其温度约为 42℃。

8. Hybrisol VII 杂交混合物（50%甲酰胺，2×SSC)(Ventana Medical Systems，Inc.，Tucson AZ)。

2.6 染色体标本的变性

1. 染色缸。

2. 20×SSC（Q-Biogene，Carlsbad CA)。室温保存。

3. 2×SSC：50mL 20×SSC、450mL 蒸馏水。室温保存。

4. 去离子甲酰胺（Q-Biogene，Carlsbad CA)：4℃保存。

5. 变性液（pH 7)：70%甲酰胺/2×SSC。可以大量配制（500mL 或 1L)，保存在 4℃。变性液可以反复使用 4 或 5 次，不用的时候保存在 4℃。

6. (75±1)℃的水浴锅。

7. 设置温度为（40±2)℃的玻片电热板。

8. 系列乙醇：70%、85%和 100%乙醇。室温保存，如果每天使用的话可以重复使用 1 周；如果每周使用 1 或 2 次，可以反复使用 4 周以上。

9. 冰冷系列乙醇：70%、85%和 100%乙醇。−20℃保存，如果每天使用的话可以重复使用 1 周；如果每周使用 1 或 2 次，可以反复使用 4 周以上。

2.7 探针变性

温度为（75±1)℃的水浴锅。

2.8 杂交

1. 玻片电热板，设置温度为 (40±2)℃。

2. 培养箱，温度设置为 37℃。

3. 22mm×22mm 的玻璃盖玻片。

4. 橡皮泥。

5. 注射器（大小为 1mL、3mL、5mL 或 10mL，根据制备的标本数量选择大小）：小心去除针头。

6. 湿盒：多数空的管尖盒可以用来做湿盒，在有架子的一半的底部铺上纸巾并用水湿透。

2.9 杂交后洗脱

1. 20×SSC（Q-Biogene，Carlsbad CA）。室温保存。

2. 4×SSC：100mL 20×SSC、400mL 蒸馏水。室温保存。

3. 4×SSC/1% Triton X-100：100mL 20×SSC、0.5mL Triton X-100、399.5mL 蒸馏水。室温保存。

4. 2×SSC：50mL 20×SSC、450mL 蒸馏水。室温保存。

5. 蒸馏水。

6. 设置温度为 (75±1)℃的水浴锅。

7. 设置温度为 39℃的水浴锅。

8. 染色缸。

9. 抗淬灭封片液（Vectashield，H-1000）（Vectore Laboratories，Burlingame，CA）。

10. DAPI 储存液（1.5μg/mL）（Vectashield with DAPI，H-1200）（Vectore Laboratories，Burlingame，CA）。

11. DAPI 复染液（0.5μg/mL）：按 400μL DAPI 储存液/800μL 抗淬灭封片液的比例稀释 DAPI 储存液。

12. 24mm×60mm 玻璃盖玻片。

3. 方法

3.1 正常男性外周血细胞的培养

1. 将核型正常男性的 500～650μL 新鲜全血加入 10mL 启动培养基中。

2. 37℃条件下培养约 72h（3d）。

3. 加入 200μL 胸苷溶液，轻轻混匀。

4. 37℃培养 14～18h（过夜）。

5. 155*g* 离心 10min。

6. 弃去上清，加入 10mL 1×PBS，颠倒混匀。

7. 155*g* 离心 10min。

8. 弃去上清，加入 10mL 连续培养基，轻轻颠倒混匀。

9. 37℃条件下继续培养 4～5h。

10. 加入 6 或 7 滴秋水仙胺溶液，颠倒混匀。

11. 37℃水浴锅中培养 20min。

12. 170*g* 离心 10min。

13. 弃去上清，留约 0.5mL 液体。轻弹离心管几次，彻底重悬细胞，避免细胞结块。迅速加入 0.5mL 75mmol/L KCl（预热在 37℃），轻弹离心管充分混匀，继续加入 4.5mL KCl。

14. 37℃水浴锅中孵育 15min。

15. 用巴斯德吸管，向每个管中从管底开始缓缓加入 1mL 新鲜配制的固定液，轻轻颠倒混匀。

16. 170*g* 离心 10min。

17. 弃上清，残留约 0.5mL 液体。

18. 边混匀边逐滴加入新鲜固定液至 5mL。

19. 室温孵育约 10min。

20. 170*g* 离心 10min。

21. 弃去上清，残留约 0.5mL 液体，将沉淀打散。

22. 边混匀边逐滴加入新鲜固定液至 5mL。

23. 必要的话，再重复步骤 20～22，2 或 3 次。

24. 弃去上清。

25. 稀释沉淀至适当浓度。溶液应混浊、轻雾状（如果得到沉淀较多，加入 1～1.5mL 固定液；如果得到沉淀较少，加入<1mL 固定液）（见注释 6）。

26. 按下述 3.2 所述方法滴片。

3.2 正常男性中期染色体标本的制备

1. 准备一个封闭环境，其相对湿度约 55%（可在 50%～60%变化），温度 24～26.5℃。

2. 将巴斯德吸管置于玻璃载片上方 2～4in 处，让一滴细胞悬液滴在玻片的左侧。然后迅速将第二滴细胞悬液滴在玻片右侧（见注释 7）。

3. 在固定液全部蒸发前，将玻片浸入盛有新鲜固定液的染色缸 1～3s，将玻片自染色缸中取出，在如步骤 1 所述的封闭的湿度/温度环境中晾干片子。

4. 在光学显微镜下检查染色体标本的质量（见注释 8）。

5. 染色体标本在室温下过夜，然后浸入 1%福尔马林中 4℃固定 5～10min。

6. 染色体标本系列乙醇脱水，70%、85%和 100%乙醇中各 2min。

7. 标本在室温下晾干，或在实验室抽风橱中微风吹过标本使标本快速干燥。

8. 在室温储存标本 2～4 周。

9. 用正常参考与正常人样品或已知不平衡性染色体异常样品，对其中一张染色体标本片进行 CGH 分析（见注释 9）。

3.3 患者和正常人样品高分子质量 DNA 的提取

按照生产商提供的说明书进行 DNA 提取。也可以选择用标准方法[10]或任何可靠的 DNA 提取试剂盒提取 DNA。

3.4 用缺口平移法标记探针

1. 荧光素-12-dUTP 用于标记患者 DNA，德克萨斯红-5-dUTP 用于标记参考 DNA。

2. 准备 15℃水浴锅，或向装满自来水的冰盒中加入少量的冰直到温度降到 15℃。

3. 将另一个水浴锅设置为 72℃。

4. 向 1.5mL 离心管中加入下述试剂（所有试剂置于冰上）：1μg 患者或参考 DNA、5μL 10×反应缓冲液混合物、5μL dNTP 混合物、1μL 荧光基团-dUTP（1mmol/L）、1μL DNA 酶（0.01～1U/μL）和 2.5μL DNA 聚合酶 I（10U/μL）。

5. 加水至总体积 50μL。

6. 将离心管短暂离心，使所有试剂都沉至管底。

7. 在 15℃水浴中孵育 60min。

8. 在 72℃水浴中孵育 10min 终止反应。

9. 在 1%琼脂糖凝胶上进行电泳检查 DNA 片段大小。最适于 CGH 的 DNA 片段大小为 300～2000bp（图 3）。如果片段太长，加入 DNA 酶 I 在 15℃水浴中继续孵育。

10. 可以进行大量样品的缺口平移标记。

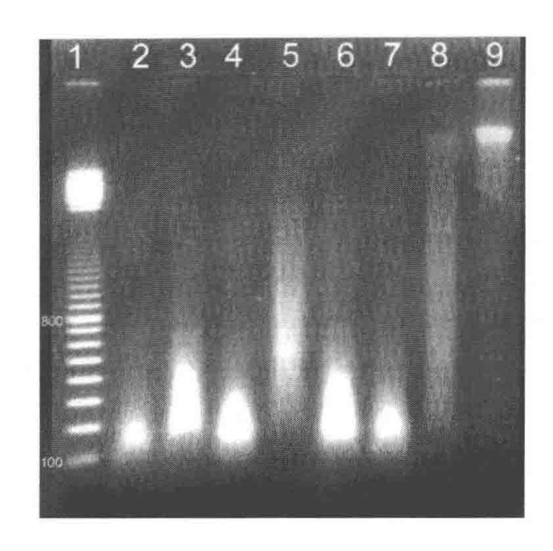


图3　采用不同浓度的 DNA 酶进行缺口平移标记的产物电泳（1%琼脂糖凝胶）结果。（泳道 1）：100bp DNA Ladder。（泳道 5 和 8）：片段大小适合作为 CGH 探针。

3.5 CGH 探针的制备

在 1.5mL 离心管中加入下述试剂：

1. 用缺口平移法标记好的正常（参考）DNA 200ng（10μL）（见注释 10）。

2. 缺口平移法标记好的患者 DNA 200ng（10μL）。

3. 20～30μg Cot 1-DNA（20～30μL）（见注释 11）。

4. 1/10 体积的 3mol/L 乙酸钠。

5. 150μL（大于 2 倍体积）100%冰冷乙醇。

6. 在－80℃放置 40～60min。

7. 29 000*g*（或离心机最大转速）于 4℃离心 40min。

8. 轻轻倒掉乙醇。

9. 用无菌的有棉花尖头的涂布器（cotton tipped applicator）吸干残余的乙醇（不要碰到沉淀）。

10. 将离心管置于电热板（42℃）上的金属架上，蒸发残余的乙醇，需时 2～3min。

11. 用 10μL Hybrisol VII 杂交混合物重悬沉淀，用上下抽吸混匀，涡旋振荡约 1min。

12. CGH 探针可以直接使用或于－20℃避光保存备用。

3.6 中期染色体标本的变性

1. 在染色缸中加入大约 50mL 变性液，将染色缸放于 75～76℃水浴中。预热变性液使其温度达到 (73±2)℃ (见注释 12)。

2. 从-20℃冰箱中取出实验所需的标本，室温下系列乙醇脱水，各 2min。

3. 室温干燥片子 (5min)，或在实验室抽风橱中微风吹过标本使标本干燥。

4. 在 37～40℃电热板上预热片子 30s。

5. 将标本浸入 (73±1)℃的变性液中变性 2.5～5min (见注释 13)。

6. 迅速取出标本，放入冰冷的 70%乙醇中 3min，然后在 85%和 100%乙醇中脱水各 3min。

7. 晾干标本玻片 (5min)，或在实验室抽风橱中微风吹过标本使标本干燥。

3.7 探针变性

在中期染色体标本片系列乙醇脱水的同时，将装有 CGH 探针的离心管在 (75±1)℃水浴中变性 10min。

3.8 杂交

1. 将注射器针筒 (已将枕头去掉) 中吸入橡皮泥。

2. 将标本片在 37～40℃电热板上预热片子约 1min。

3. 标本片在电热板上，将每个 CGH 探针加到标本的同一个杂交区域上 (见注释 10)，每个杂交区域盖上 22mm×22mm 玻璃盖玻片。

4. 用注射器挤压橡皮泥，沿着盖片边缘进行封片。

5. 37℃湿盒中孵育标本 2～3d。

3.9 杂交后洗脱

1. 在染色缸中加入大约 50mL 的 2×SSC 溶液，预热使其温度达到 72℃左右 (水浴锅温度设置在大约 75℃)。

2. 在染色缸中加入大约 50mL 的 4×SSC 溶液，预热使其温度达到 37℃左右 (水浴锅温度设置在大约 39℃)。

3. 在染色缸中加入大约 50mL 的 4×SSC/0.1% Triton X-100 溶液，预热使其温度达到 37℃左右 (水浴锅温度设置在大约 39℃)。

4. 在染色缸中加入大约 50mL 的 2×SSC 溶液，室温放置。

5. 在染色缸中加入大约 50mL 的蒸馏水，室温放置。

6. 从标本片上除去橡皮泥。

7. 轻轻滑掉盖片（不要划伤标本）。

8. 将标本片置于（72±2)℃的 2×SSC 溶液中，晃动标本片 2 min，然后在该溶液中停留 5min。

9. 将标本片转移到 37℃ 的 4×SSC 溶液中放置 5min。

10. 将标本片转移到 37℃ 的 4×SSC/0.1% Triton X-100 溶液中放置 5min。

11. 将标本片转移到 37℃ 的 4×SSC 溶液中放置 5min（可使用与步骤 9 中的同一溶液）。

12. 将标本片转移到室温下的 2×SSC 溶液中停留 5min。

13. 将标本片转移到室温下的水中停留 5min。

14. 标本片自水中取出，置于暗处室温晾干；或在实验室抽风橱中微风吹过标本使标本快速干燥。

15. 在标本片的靶区域上加 10μL DAPI 复染剂。

16. 盖上盖玻片。

17. 将标本片置于暗处 5～10min，然后进行 CGH 图像抓取和分析。

18. 拍摄至少常染色体各 10 个，性染色体各 7 个。

4. 注释

1. 一般选择正常男性对照，这样使得一张中期染色体标本片中同时有 X 染色体和 Y 染色体。

2. 如果初步细胞遗传学分析已在其他实验室完成，患者的血样应放入有肝素钠的管中，可随后进行提取 DNA 或需要的话进行外周血培养用于 FISH 实验。在这种情况下，采血量最好超过 3mL。如果患者是婴儿，采血量通常小于 3mL，只要血量足够进行 DNA 提取即可。

3. 可以提取大量男性和女性参考 DNA，储存在－20℃备用。

4. 每批新的 DNA 酶要进行 0.0～0.1U/mL 的浓度梯度实验，通过琼脂糖凝胶电泳以确定哪种浓度能得到最理想大小的 DNA 片段，一般用该浓度的 DNA 酶进行标记效果理想。

5. 一次标记超过 1μg DNA 可得到大量的标记参考 DNA，可储存在－20℃。

6. 应制备一张标本片进行预试验以确定有丝分裂指数，评估是否需要用固定液稀释细胞悬液，或离心后用较少体积的固定液重悬细胞。

7. 一张载片上滴两个区域，可以在一张片子上同时进行两个不同的 CGH 实验，但是应确保两个区域的染色体都分散良好。

8. 进行中期染色体标本片的制备，其目标是：①得到的中期染色体分散均

匀、相当染色体臂比较直、染色体之间重叠较少；②载玻片和染色体上残留的细胞质尽可能少；③相差显微镜下观察中期染色体呈现灰色［不太黑和（或）太亮，也不太浅或太朦胧］。

9. 中期染色体标本片的质量是CGH过程中最关键的因素。每批标本片都应进行预实验，质量比较好的标本片储存在－20℃。在滴制片后约两周进行预实验，一旦结果满意，在－20℃储存这批标本片。一般整批标本片的质量相似，如果一批标本片没有得到满意的结果，这批标本片可以用于其他实验如FISH，或扔掉。在精通中期染色体标本制备的实验室中，应该首选他们常用的中期染色体制备方法。许多情况下，能满足注释8中标准的中期染色体同样适合CGH分析。

10. 制备CGH探针时，应考虑制备两种不同的探针，一种是与患者性别相同的参考探针，另一种是性别不同的参考探针。性别相同的探针在揭示染色体（包括性染色体）的不平衡性染色体异常时非常重要。如果一张片子的两个杂交区域采用两种探针（见注释7)，性别不同的参考探针可以作为内对照，因为预期整条性染色体颜色比率不同。

11. 标记病例（marker case）中采用约20μg Cot 1-DNA，而所有其他病例中采用约30μg Cot 1-DNA。绝大多数的标记染色体含有着丝粒，对于某些病例采用较少的Cot 1-DNA提高检测效能。

12. 变性液应预热至少30min。溶液可在微波炉中用最高档20s以加速预热过程。

13. 确定每批标本片的最适变性时间。合适的标本在较大范围的变性时间内都可得到好的杂交结果和DAPI反转带型。最初变性时间可以尝试3.5～4min。

（陈　艳 译，刘青杰 校）

参考文献

1. Bryndorf, T., Kirchhoff, M., Rose, H., Maahr, J., Gerdes, T., Karhu, R., et al. (1995) Comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. *Am. J. Hum. Genet.* **57,** 1211–1220.
2. Levy, B., Gershin, I. F., Desnick, R. J., Babu, A., Gelb, B. D., Hirschhorn, K., et al. (1997) Characterization of a de novo unbalanced chromosome rearrangement by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* **76,** 68–71.
3. Levy, B., Dunn, T. M., Kaffe, S., Kardon, N., and Hirschhorn, K. (1998) Clinical applications of comparative genomic hybridization. *Genet. Med.* **1,** 4–12.
4. Levy, B., Papenhausen, P. R., Tepperberg, J. H., Dunn, T. M., Fallet, S., Magid, M. S., et al. (2000) Prenatal molecular cytogenetic diagnosis of partial tetrasomy 10p due to neocentromere formation in an inversion duplication analphoid marker chromosome. *Cytogenet. Cell Genet.* **91,** 165–170.
5. Gardner, R. J. M. and Sutherland, G. R., eds. (1996) *Chromosome Abnormalities and*

Genetic Counseling. Oxford University Press, New York.

6. Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J. W., Waldman, F., et al. (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* **258,** 818–821.
7. du Manoir, S., Speicher, M. R., Joos, S., Schröck, E., Popp, S., Dohner, H., et al. (1993) Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. *Hum. Genet.* **90,** 590–610.
8. Kallioniemi, O. P., Kallioniemi, A., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J. W., Waldman, F., et al. (1993) Comparative genomic hybridization: a rapid new method for detecting and mapping DNA amplification in tumors. *Semin. Cancer Biol.* **4,** 41–46.
9. Kallioniemi, O. P., Kallioniemi, A., Piper, J., Isola, J., Waldman, F. M., Gray, J. W., et al. (1994) Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosomes Cancer.* **10,** 231–243.
10. Piper, J., Rutkowitz, D., Sudar, D., Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. P., Waldman, F . M., et al. (1995) Computer image analysis of comparative genomic hybridization. *Cytometry* **19,** 10–26.
11. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., eds. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Vol. 1–3. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York.

第10章　彩色显带

Vicki L. Hopwood，Christi J. Hada，
Armand B. Glassman

1. 引言

1.1　历史

1.1.1　显带技术

20世纪70年代初，许多使得人类染色体显现出可重复的不同宽度条带的染色体显带技术相继建立。这些技术包括1969年Caspersson发现的一种荧光显带技术Q显带、1971年由Sumner和Seabright提出的G显带和1971年由Dutrillaux和Lejeune提出的R显带[1~4]。目前用热盐溶液或蛋白水解酶预处理得到的常规G显带仍然是染色体识别的金标准。

虽然G显带技术仍然是临床细胞遗传学中的金标准，但当染色体太短而无法检测到微小异常、当染色体形态很差、当核型中含有标记染色体或染色体发生复杂的多次重排时，这些形态学和技术上的困难则造成无法用G显带识别染色体。

1.1.2　荧光原位杂交（FISH）

将有色DNA探针杂交到不同染色体的着丝粒上的FISH技术于1986年建立，之后发展出一系列FISH技术试图描述传统细胞遗传学方法不能确定的染色体异常[5]。1988年，通过荧光激活的二元染色体流式分选法（FACS）得到DNA涂染探针。用流式分选得到的染色体，通过DOP-PCR法建立单一染色体的DNA文库。已证实全染色体涂染探针对验证G显带提示的可疑染色体易位非常有意义[6~7]。

1.1.3　多色FISH

到20世纪80年代末，建立了多色FISH方法，一般采用不同荧光染料组合或按比例标记DNA探针，得到多种特定的颜色组合[8~10]。90年代初，采用多达7种的不同颜色进行组合对单一染色体同时着色。很快就由此得到启发，发展出针对染色体不同区域的亚区带探针，用于生成一套多种颜色构成的染色体条形

码，能够在一次杂交中同时分析多个染色体区域[11~13]。1996 年，两个不同的研究小组发现用 5 种不同荧光素（Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5 和 FITC）组合标记能够得到足够多的混合色，为 24 条染色体分别染上不同颜色[14,15]。

1.1.4 用人 DNA 探针进行彩色显带

1997 年，英国剑桥大学的一个研究小组成功提出一种对人的所有染色体进行独特标记的彩色显带技术[16]。采用红色或绿色荧光素标记 2 套亚区带 DNA 探针，可获得分辨率为每组单倍体 110 条不同条带的彩色带型。探针与用常规细胞遗传学空气干燥技术制备的人类中期染色体杂交，用 DAPI 复染。DNA 探针用两种不同颜色分组标记，能够得到一种沿着染色体短臂到长臂的 4 色带型。当 DNA 片段只结合一套探针时呈现红色或绿色，当染色体片段等量结合两套探针时为黄色，当没有探针结合时为蓝色。亚区带 DNA 探针是以体细胞杂交株(人/啮齿动物）片段为模板进行 Alu PCR 的产物，这些片段涉及人类基因组的 300 个以上区域[17]。Alu PCR 只特异性扩增人类 DNA 而不扩增啮齿动物 DNA，因为 Alu 重复序列只存在于灵长类 DNA 中。

1.1.5 用灵长类 DNA 探针进行彩色显带

英国剑桥大学的同一研究小组提出采用种间比较基因组杂交进行彩色显带的技术。该研究团队（包括 Malclom A、Ferguson-Smith、Johannes Wienberg 和 Stefan Muller 等）称该技术为种间彩色显带，因为他们采用 FACS 制备的长臂猿（*Hylobates concolor* 和 *Hylobates syndactylus*）染色体 DNA 探针得到人类染色体的彩色带型[18]。这些长臂猿 DNA 探针分别用 FITC、Cy3 和 Cy5 这 3 种荧光染料组合标记得到 7 种颜色的带型。长臂猿属于巨型猿类，长臂猿 DNA 和人类 DNA 约 98%序列是同源的。由于存在广泛的序列同源，且从巨型猿类到人的种系进化过程中产生了染色体进化重排，我们可得到彩色显带。探针与人类 DNA 杂交后，这些进化重排为不同染色体提供了独特的彩色条带。在这篇研究论文中，识别出大约 100 个条带。除染色体 15、18、21、22 和性染色体外，每条染色体呈现出 2～6 种不同颜色的亚区带。

在此发现之前，人类染色体涂染探针曾用于研究巨型猿类、长臂猿和古代猴的种系进化[19~24]。这是第一次将高等灵长类 DNA 与人类染色体杂交，得到了独特的特异性彩色带型。研究者们利用荧光显微镜（含四带通滤光片）和数字成像系统，采用多色 FISH 技术，通过一次杂交试验得到这种彩色种间显带。

1.2 彩色显带的应用

1.2.1 肿瘤细胞遗传学

G 显带技术仍然是肿瘤细胞遗传学中金标准，它简单而有效。GTG 显带技术用于核型异常的初筛。然而，肿瘤细胞中的染色体分裂相通常具有非常复杂的核型，或染色体形态太差。

描述染色体断裂点是癌症诊断和预后的重要方面。种间彩色显带能识别标记染色体和重新详细阐释复杂重排中的 ISCN 带。到目前为止，已用商品化的探针试剂盒 RxFISH（Rainbow cross-species FISH）对 25 种血液恶性肿瘤和 13 种实体瘤进行了分析[25～31]。在所有的病例中，彩色显带技术证实或识别出常规细胞遗传学方法不能识别的复杂染色体改变。采用种间彩色显带，直接影响细胞遗传学数据的积累速度和文献报道中断裂点的准确率。

常见染色体断裂点与肿瘤抑制基因、原癌基因和其他在细胞生长、抗药性和凋亡通路中起作用的基因相关联。当充分了解这些常见染色体断裂点的特征后，将对患者确诊和预后起重要作用，进而具有影响患者治疗的可能性。

1.2.2 组成性细胞遗传学和产前细胞遗传学

有两篇文献报道 RxFISH 用于研究组成性染色体重排。用彩色显带技术共分析了 4 个病例，包括一例发生 4q 部分重复和 4p 缺失的 32 周龄胎儿[32]。对胎儿脐带血进行 GAG 显带，观察到不平衡易位核型，该核型显示在 4p 上有不明来源的物质。用彩色显带分析可以确定这是一例 4q26-qter 部分三体和 4p16 单体。用 LSI Wolf-Hirschhorn 探针（Vysis）证实 Wolf-Hirschhorn 关键区域缺失。Muller 等用下述组成性染色体异常：一例 t(1;2)(q37;q42.3)、一例近着丝粒倒位 inv(2)(p23q13)和一例近着丝粒倒位 inv(6)(p25q22)来说明种间彩色显带技术的应用性[18]。

1.3 彩色显带策略的优势和局限性

1.3.1 优势

种间彩色显带技术是一种简单快速地检测用 G 显带无法识别的染色体异常的方法[25～32]。当 GTG 显带不能给单条染色体涂染探针分析提供足够线索时，该技术尤其有用。另外，彩色显带技术能够检测染色体内部的异常，如倒位、重复和用其他多重 FISH 技术（如 M-FISH 和 SKY）不能检测到的微小缺失。所有文献著者都认为将该技术与 G 显带和其他 FISH 检测系统结合运用有很大的优势。

1.3.2 局限性

彩色显带分辨率只有大约 100 条带或更少。这些数量的条带能显示一些染色体间的差异，但不足以确定微小易位、缺失或倒位。另外，用该技术无法识别涉及涂染相同颜色区带的染色体易位。

2. 材料

1. 常规细胞遗传学方法制备的染色体标本。
2. 10μL RxFISH 探针（Applied Imaging，Santa Clara，CA），－20℃保存。
3. 分子生物学纯度甲酰胺：用 2×SSC 稀释成 50%和 70%，pH 7.5。
4. 乙醇：变性 HPLC 纯度，浓度为 70%、85%和 100%。
5. 100%甲醇 。
6. 冰乙酸。
7. 20×SSC，pH 7.0。
8. 2×SSC，pH 7.0。
9. 2mol/L HCl。
10. Tween-20。
11. 兔抗 FITC 抗体（DAKO，V0403）。
12. FITC 标记的山羊抗兔 IgG 抗体（Vector，FI-1000）。
13. DAPI（Vysis，32-804831）。
14. 盖玻片（22mm×22mm）。
15. 玻璃染色缸（50mL）。
16. 显微载玻片。
17. 37℃湿盒。
18. 纯水（蒸馏、去离子）。
19. 橡皮泥。
20. 相差显微镜。
21. 设定温度为 37℃、45℃、65℃和 72℃的水浴锅。
22. 设定温度为 37℃的烤箱。
23. 设定温度为 60～65℃的带金属载玻片平盘的烤箱。
24. 微量移液器和枪头。
25. pH 计。
26. 微型离心机和小离心管。
27. －20℃冰箱。

28. RxFISH Cyto Vision 系统（Applied Imaging，Santa Clara，CA）。

29. 附含 4 块滤色块的自动滤片轮的荧光显微镜。

30. 冷 CCD 摄像机。

3. 方法

3.1 标本制备和老化

1. 用甲醇/冰乙酸固定的方法制备细胞悬液。

2. 滴一滴细胞悬液于载玻片上，在染色体铺展所需的适宜温度（25℃）和湿度（45%～50%）条件下干燥标本。

3. 用相差显微镜检测标本片的质量，在玻片上画出染色体分散良好或感兴趣的中期染色体区域。

4. 在 60℃烤箱中放置 2h，老化当天制备的标本；或在 60℃烤箱中烤 1h 老化室温过夜的片龄 1d 的标本片。将老化后的标本置于室温下，以备进行 RxFISH 的后续步骤。

5. 标本在室温下的 70%、85%和 100%系列乙醇中各脱水 2min，空气干燥。

3.2 变性和杂交用溶液的配制

1. 配制 70%乙醇，放于−20℃冰箱中。

2. 配制 50mL 70%甲酰胺/2×SSC（pH 7.5）放在 72℃水浴锅中。

3. 配制 70%、85%和 100%乙醇，室温保存。

4. 准备湿盒，37℃预热。

3.3 探针变性

1. 将装有 RxFISH 探针的离心管在 37℃水浴中预热 5min。

2. 轻轻混匀，稍离心。

3. 用无菌枪头按每张标本 10μL 的探针量移液到 0.5mL 离心管，盖好管盖。

4. 将不用的 RxFISH 探针放回−20℃。

5. 65℃水浴中变性 RxFISH 探针 10min。

6. 将变性过的探针于 37℃水浴中放置 10min～2h 备用。

3.4 标本变性

1. 确保染色缸内的 70%甲酰胺/2×SSC 溶液温度为理想的 72℃（见注释 1 和 2）。

2. 在 70%甲酰胺/2×SSC 溶液中变性标本（不超过 4 张）1.5min（见注释 3）。

3. 迅速将变性标本于－20℃冰冷的 70%乙醇中淬灭（见注释 4）。

4. 将标本依次在室温条件下的 70%、85%和 100%系列乙醇中各脱水 2min，空气干燥。

3.5 杂交

1. 降低环境亮度，避免 RxFISH 探针光漂白（见注释 5）。

2. 取 10μL 变性探针混合物加在标本片上画出的杂交区域（含有分散良好的染色体或感兴趣的中期分裂相）。

3. 缓慢盖上 25mm×25mm 盖玻片，避免产生气泡。

4. 让探针溶液铺展到盖玻片的边缘，轻扣盖片，在不移动盖片的情况下排除气泡。

5. 用橡皮泥封片。

6. 37℃湿盒中孵育 48h（见注释 6）。

3.6 配制杂交后步骤所需溶液

1. 配制 150mL 2×SSC 溶液（pH 7.0），分装在 3 个染色缸中，放在 45℃水浴锅中（见注释 7）。

2. 配制 100mL 50%甲酰胺/0.5×SSC 溶液（pH 7.0），分装在 2 个染色缸中，放在 45℃水浴锅中。

3. 分装 50mL pH 7.5 的 4×Tween 溶液（500mL 4×SSC 和 0.25mL Tween-20 储存液）在 1 个染色缸中，放在 45℃水浴锅中。

3.7 杂交后洗脱

1. 用镊子小心除去橡皮泥，将标本放入第一缸的 2×SSC 中 45℃孵育 5min，滑落盖玻片（见注释 8～10）。

2. 在 50%甲酰胺/0.5×SSC 溶液中洗片 5min，将标本转到下一缸同样溶液

中，重复洗片 5min。

3. 在 2×SSC 溶液中洗标本 5min，将标本转到下一缸 2×SSC 溶液中洗 5min。

4. 将标本转到 4×Tween 溶液中，45℃孵育 10min。

3.8 抗体检测步骤（可选择的）

1. 在上述的 3.7 中的第二次甲酰胺洗片的同时，室温条件下 14 000*g* 离心两种检测 FITC 的抗体 10min，只用上清进行下面的实验。

2. 在小离心管中加入 1μL 兔抗 FITC 抗体和 199μL 4×Tween 溶液，轻轻混匀稀释液。室温避光孵育 10min。

3. 甩去标本上的多余液体。

4. 向每张标本片加 200μL 兔抗 FITC 抗体 1∶200 稀释液，37℃湿盒中孵育 30min。

5. 将水浴锅温度由 45℃降至 42℃，预热装有 4×Tween 溶液的 50mL 染色缸，同时预热 6 次洗脱所需的 250mL 45×Tween 溶液。

6. 检查以确保水浴锅和 4×Tween 溶液温度为 42℃。然后移去标本上的盖片，洗片 5min。倒掉溶液，加入新鲜预热的 4×Tween 溶液，再洗片 5min。重复一次该步实验。

7. 在洗脱的过程中，向另一离心管中加入 2μL FITC 标记的山羊抗兔 IgG 抗体和 198μL 4×Tween 溶液，轻轻混匀稀释液。室温避光孵育 10min。

8. 甩去标本上的多余液体。

9. 向每张标本上加 200μL FITC 标记的山羊抗兔 IgG 抗体 1∶100 稀释液，37℃湿盒中孵育 30min。

10. 检查水浴锅和 4×Tween 溶液温度为 42℃，然后洗片 3 次，每次 5min。

3.9 DAPI 复染

将 10μL 复染剂和抗淬灭剂溶液加到标本上，并用盖玻片（22mm×22mm）封片（见注释 11）。

3.10 图像捕获和分析

1. 打开计算机，在研究菜单下选择 RxFISH 软件。打开软件后，选择捕获界面。开始图像捕获前，将滤色块轮设定到适合的顺序。捕获的探针信号保存在原始图像图层中，组合得到最终图像。Rx-Cy5 信号最先捕获，随后依次是 Rx-

Cy3、Rx-FITC 和 Rx-DAPI。

2. 用 FITC 进行中期扫描。FITC 荧光信号不容易淬灭，所有的分析过程可以保持明亮。当找到一个中期后，在 100×油镜头下聚焦，然后选择 Rx-Cy5。

3. 肉眼无法观察到 Rx-Cy5，需要依赖计算机图像来了解详细信息。当曝光设定为 5s 时，应能够在黑暗背景下检测到微弱的白色图像。缓慢聚焦增加清晰度，因为在照相机和软件之间存在时间延迟。调节明暗直至得到好的对比度（约 90%准确度）。针对不同的图像设置应略微调整。

4. 点击“Live”按钮，滤色块轮将自动转到列表中的下一个荧光滤色块。大多数情况下其他的荧光信号曝光 2s 即可。一旦得到清晰带型的图像时，点击“Capture”按钮。

5. 完成所有 4 个荧光信号的捕获后，选择标记有“RxFISH Image Capture”的界面。在选择的界面内，完成整套图像的合成。保存所有的图像，即使有提示也不要删除，这些图像在分析中非常有用。

6. 激活“Analysis”菜单，选择你想要分析的细胞。选择“Load cell”将显示多色显带的染色体（见注释 12）。在“Analysis Customize”菜单下，RxFISH 图像也可显示为 DAPI 反转图像，可帮助识别染色体。“Analysis Profile”工具用于显示每条染色体强度曲线。

7. 用“Analysis”命令可分开染色体，只要一完成染色体分离，就可用“Classifier”和“Auto”命令产生细胞的核型。

4. 注释

1. 变性步骤是操作程序中非常关键的。变性时间和温度由标本的类型和片龄决定。每个实验者应根据自己需要确定适宜的温度和时间。一般在 70～75℃温度范围和 1.5～2min 时间范围内能够得到好的结果。

2. 整个实验过程中，应在使用前检查每个染色缸中的液体温度。通常染色缸中的液体温度比水浴锅的温度至少低 1℃。

3. 每张室温标本放入 72℃甲酰胺中将降低 70%甲酰胺/2×SSC 的溶液温度 0.5～1℃；如果一次放入超过 4 张标本，70%甲酰胺/2×SSC 的温度将不足以进行变性。

4. 如果处理超过 4 张标本片，70%甲酰胺/2×SSC 和第一缸 70%乙醇必须调回它们的初始温度，即分别为 72℃和－20℃。

5. Cy5 荧光染料在红外波长范围内非常敏感，易被白光激发，因此在图像捕获过程中，应首先进行捕获，因为它将第一个淬灭掉的荧光。

6. 标本在 37℃湿盒中杂交 12～96h。探针杂交时间不要少于 12h，因为这会使信号强度将大大降低。杂交 48h 能够得到稳定的强信号，这是成功捕获图像所

必需的。可根据各实验室的经验减少杂交时间。

7. 为确保结果的质量，每天倒掉使用过的溶液。变性步骤中用的溶液不能储存起来用于杂交后洗脱步骤。

8. 杂交后洗脱的步骤应在弱光的条件下完成，避免直接标记荧光染料（Cy5和Cy3）光漂白。

9. 在杂交后的所有实验步骤中，标本片不能干掉。

10. 如果盖片不能从载片上滑下来，将标本片放于2×SSC中再次洗脱5min，再检查盖片是否滑落。

11. 标本片在−20℃避光保存，以备拍照。

12. 如果染色体彩色带型颜色比较淡，不够明亮，在比较暗的设置下（减少曝光时间）重新捕捉图像。在图像捕捉前调好焦距，缩短曝光时间以减少延迟。照相机有个芯片收集荧光，然后将信息传递到计算机中，这就是为什么出现延迟的原因。DAPI图像不应该太暗，它为其他荧光颜色提供背景。如果DAPI图像不够亮，染色体看起来边缘参差不齐。由于同样的原因，调节好DAPI图像的焦距是很有必要的。

（马 芬 译，刘青杰 校）

参考文献

1. Caspersson, T., Zech, L., and Johansson, C. (1970) Differential binding of alkylating fluorochromes in human chromosomes. *Exp. Cell Res.* **60,** 315–319.
2. Sumner, A. T., Evans, H. J., and Buckland, R. A. (1971) New technique for distinguishing between human chromosomes. *Nature New Biol.* **232,** 31–32.
3. Seabright M. (1971) A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* **11,** 971–972.
4. Dutrillaux, B. and Lejeune, J. (1971) A new technic of analysis of the human karyotype. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l Academie des Sciences—D: Sciences Naturelles* **272,** 2638–2640.
5. Pinkel, D., Straume, T., and Gray, J. W. (1986) Cytogenetic analysis using quantitative high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83,** 2934–2938.
6. Pinkel, D., Landegent, J., Collins, C., et al. (1988) Fluorescence in situ hybridization with human chromosome specific libraries: Detection of trisomy 21 and translocation of chromosome 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85,** 9138–9142.
7. Lichter, P., Cremer, T., Borden, J., Manuelidis, L., and Ward, D. C. (1988) Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by *in situ* suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum. Genet.* **80,** 224–234.
8. Nederlof, P. M., Robinson, D., Abunesha, R., et al. (1989) Three color fluorescence in situ hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences. *Cytometry* **10,** 20–27.
9. Nederlof, P. M., Van der Flier, S., Wiegant, J., et al. (1990) Multiple fluorescence *in situ* hybridization. *Cytometry* **11,** 126–131.
10. Nederlof, P. M., van der Fleier, S., Wiegant, J., et al. (1992) Fluorescence ratio measurements of double-labeled probes for multiple *in situ* hybridization by digital imaging microscopy. *Cytometry* **13,** 839–845.

11. Lengauer, C., Green, E. D., and Cremer, T. (1992) Fluorescence *in situ* hybridization of YAC clones after Alu-PCR amplification. *Genomics* **13,** 826–828.
12. Lengauer, C., Speicher, M. R., Popp, S., et al. (1993) Chromosomal bar codes produced by multicolor fluorescence *in situ* hybridization with multiple YAC clones and whole chromosome painting probes. *Hum. Mol. Genet.* **2,** 505–512.
13. Ried, T., Baldini, A., Rand, T. C., and Ward, D. C. (1992) Simultaneous visualization of seven different DNA probes by *in situ* hybridization using combinatorial fluorescence and digital imaging microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89,** 1388–1392.
14. Schrock, E., du Manoir, S., Valman, T., et al. (1996) Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. *Science* **273,** 494–497.
15. Speicher, M. R., Ballard, G. S., and Ward, D.C (1996) Karyotyping human chromosomes by combinatorial multifluor FISH. *Nat. Genet.* **12,** 368–375.
16. Muller, S., Rocchi, M., Ferguson-Smith, M. A. and Wienberg, J. (1997) Toward a multicolor chromosome bar code for the entire human karyotype by fluorescence *in situ* hybridization. *Hum. Genet.* **100,** 271–278.
17. Antonacci, R., Marzella, R., Finelli, P., Lonoce, A. and Forabosco, A. (1995) A panel of subchromosomal painting libraries representing over 300 regions of the human genome. *Cytogenet. Cell Genet.* **68,** 25–32.
18. Muller, S., O'Brien, P. C., Ferguson-Smith, M. A., and Weinberg, J. (1998) Cross-species color segmenting: A novel tool in human karyotype analysis. *Cytometry* **33,** 445–452.
19. Wienberg, J., Jauch, A., Stanyon, R., and Cremer, T. (1990) Molecular cytotaxonomy of primates by chromosomal *in situ* suppression hybridization. *Genomics* **8,** 347–350.
20. Jauch, A., Wienberg, J., Stanyon, R., et al. (1992) Reconstruction of genomic rearragements in great apes and gibbons by chromosome painting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89,** 8611–8615.
21. Wienberg, J., Stanyon, R., Jauch, A., and Cremer, T. (1992) Homologies in human and Macaca fuscata chromosomes revealed by *in situ* suppression hybridization with human chromosome specific DNA libraries. *Chromosoma* **101,** 265–270.
22. Koehler, U., Arnold, N., Wienberg, J., Tofanelli, A. and Stanyon, R. (1995) Genomic reorganization in the concolor gibbon (*Hylobates concolor*) revealed by chromosome painting. *Genomics* **30,** 287–292.
23. Kohler, U., Bigoni, F., Wienberg, J. and Stanyon, R. (1995) Genomic reorganization and disrupted chromosomal synteny in the Siamang (*Hylobates syndactylus*) revealed by fluorescence *in situ* hybridization. *Am. J. Phys. Anthropol.* **97,** 37–47.
24. Wienberg, J. and Stanyon, R. (1997) Comparative painting of mammalian chromosomes. *Curr. Opin. Genet. Develop.* **7,** 784–791.
25. Teixera, M., Micci, F., Dietrich, C., and Heim, S. (1999) Cross-species color banding characterization of chromosomal rearrangements in leukemias with incomplete G-band karyotypes. *Gene Chromosom. Cancer* **26,** 13–19.
26. Micci, F., Teixeira, M. R., Dietrich, C. U., Saeter, G., Bjerkehagen, B. and Heim, S. (1999) Combined RxFISH/G-banding allows refined karyotyping of solid tumors. *Hum. Genet.* **104,** 370–375.
27. Harrison, C. J., Gibbons, B., Yang, F., et al. (2000) Multiplex fluorescence in situ hybridization and cross species color banding of a case of chronic myeloid leukemia in blastic crisis with a complex Philadelphia translocation. *Cancer Genet. Cytogenet.* **116,** 105–110.
28. Teixeria, M. R., Micci, F., Dietrich, C. U., and Heim, S. (2000) Detailed genome-wide screening for inter- and intrachromosomal abnormalities by sequential G-banding and RxFISH color banding of the same metaphase cells. *Cancer Genet. Cytogen.* **119,** 94–101.

29. Espinet, B., Sole, F., Salido, M., et al. (2000) Application of cross-species color banding (RxFISH) in the study of T-prolymphocytic leukemia. *Haematologica* **85,** 607–612.
30. Koo, S. H., Kwon, K. C., Park, J. W., Lee, Y. E., and Kim, J. W. (2000) Characterization of chromosomal breakpoints in an ALL patient using cross-species color banding. *Cancer Genet. Cytogenet.* **119,** 118–120.
31. Zhao, L., Hayes, K., and Glassman, A. (2000) Enhanced detection of chromosomal abnormalities with the use of RxFISH multicolor banding technique. *Cancer Genet. Cytogenet.* **118,** 108–111.
32. Petek, E., Wagner, K., Steiner, H., Schaffer, H., and Kroisel, P. M. (2000) Prenatal diagnosis of partial trisomy 4q26-qter and monosomy for the Wolf-Hirschhorn critical region in a fetus with split hand malformation. *Prenatal. Diagnosis* **20,** 349–352.

第 11 章　多色纤维荧光原位杂交

Jaennelle Kraan, Anne R. M. von Bergh,
Karin Kleiverda, Jan-Willem Vaandrager,
Ekaterina S. Jordanova, Anton K. Raap,
Philip M. Kluin, Ed Schuuring

1. 引言

在人类许多疾病中都可观察到各种遗传学异常。从染色体数目异常、缺失和特意区域的阔增到染色体易位和插入各有不同。在过去的 10 年间，已经发展出检测这些异常的多种荧光原位杂交（FISH）方法。间期核 FISH 技术是广泛用于检测染色体树木异常、DNA 扩增和 10～1000kb 范围内结构异常的方法之一。间期细胞遗传学分析要求预先了解染色体畸变所涉及的 DNA 序列信息，尤其对于进行如染色体易位断裂点的结构异常诊断检测时，间期方法高度依赖于有效使用合适的跨断裂点探针。

最近，发展了一套统称为纤维 FISH 的高分辨率 FISH 方法。开展纤维 FISH 技术的基础是从细胞核中释放 DNA 分子并将这种线状伸展的 DNA 固定到载玻片上。DNA 纤维与覆盖整个目标区域的一套不同荧光染料标记的探针杂交，产生一种特征性线性分布的 FISH 信号，该信号代表一种多色条形码（barcode）（图 1A，B）。理论上可以产生多达 1000kb 的条形码，但是实际上常用的条形码长度大约在 300kb。当研究较大的目标区域时，靶 DNA 的人工断裂可能会使结果判读变得复杂。

由于纤维 FISH 具有高而宽的分辨率范围（1～1000kb）及其产生多色条形码的能力，证实它非常适于作为辅助物理作图工具、用于长度多态性分析的工具；与 PCR、Southern 杂交和间期 FISH 相比，更有价值的是在大的基因组范围内准确定位染色体重排区域的分子病理学研究工具。

本章我们将简单概述纤维 FISH 的发展史，描述它的一些应用并详细介绍过去几年本实验室使用的纤维 FISH 实验程序。

1.1　纤维 FISH 技术的发展

已经描述并发展了多种从细胞核中释放并制备线状延伸的 DNA 方法[1]。这



图 1 （A）纤维 FISH 定位 ETV6(12p13)基因 t(9;12)(q34;p13)的断裂点图。正常的 300kb 条形码由 7 个黏粒探针组成，重叠的黏粒图谱如图所示。上面的纤维代表正常的等位基因，示正常条形码图谱的杂交图。第二条和第三条纤维示断裂点产物的互补图谱。白血病细胞中的断裂点定位在中间黏粒上（箭头所示）。（B）使用包括 200kb 插入片段基因的两个特异的条形码同时进行杂交。上面的纤维示一个基因（*MLL* 基因位于 11q23）的正常条形码；而下面的纤维示配体基因（*AF4* 基因位于 4q21）的正常条形码；中间的那条纤维表明了肿瘤 DNA 中两位点的连接。本例中 *MLL* 基因条形码的一部分插入到 *AF4* 基因中[20]。值得注意的是，一个简单的单色条形码也能够准确定位断裂点。（C）用碘化丙锭染色纤维，载玻片上的细胞核如果呈现为亮红色的球状，表明细胞裂解不充分。（D）用碘化丙锭染色纤维，如果载玻片看起来为云雾状并有发亮的晶体出现，如本照片所示，表明细胞用量太大。（E）用碘化丙锭染色纤维，本图中的细胞裂解充分并沿载玻片均匀地分布，DNA 晕圈呈彗星状结构。（F）采用 250kb 双色（红色和绿色）黏粒条形码进行纤维 FISH 杂交。使用双色或三色滤光片观察纤维，很容易识别线性排列的串珠状纤维信号和单一背景信号（见书后彩图）。

些方法有不同的名称，包括高分辨率 FISH（high resolution FISH）、分子梳（molecular combing）、DNA 纤维 FISH（DNA fiber FISH）、晕圈 FISH（halo FISH）和直接目视杂交（DIRVISH）[2~7]。所有的方法都是基于将大部分 DNA 内容物释放于显微镜下的载玻片上并使 DNA 线性化，多数是从新鲜细胞、冻存细胞或组织中制备细胞核并在 DNA 释放前将其置于载玻片上[1]；采用的其他方法是利用凝胶块或溶液制备分离基因组 DNA[2]。对于线性化的基因组 DNA 来说，大多数方法依赖于使用机械力或重力，Wiegnant 等[4]使用晕圈的方法从细胞核中释放 DNA，这种方法最初是早在 20 世纪 60 年代用于使用电子显微镜观察 DNA 链。用这个方法，释放 DNA 并使用高盐的溶液抽提组蛋白，包括通过使用 DNA 嵌入剂碘化丙锭和 UV 照射诱导单链断裂，使 DNA 解旋。本章所阐述的纤维 FISH 方法是基于此种 DNA 晕圈技术。

细胞核 DNA 纤维延伸和固定后，即可作为针对目标区域的不同半抗原或荧光染料标记的多个探针的杂交靶。据估计 2～4kb 的 DNA 片段将杂交成单信号；克隆在大插入片段载体中的基因组探针，如黏粒、PAC 和 BAC，一般插入片段为 30～150kb，单个探针杂交可见多个线性排列的串珠信号（图 1A、B、F）。信号的总长度（如线状排列的串珠集合）与探针的实际大小（或复杂性）一致（在标准差 1～2kb 的限度内），使得遗传距离近似于物理距离（3kb＝1μm）。由于探针典型的线性排列的串珠状信号，很容易与其他非特异性的单杂交背景信号区分开（图 1F），纤维 FISH 可以使用低严紧度的杂交和洗脱条件，这是优于间期 FISH 的一个最重要的优势，尤其在实验中使用混合探针时该优势更为明显。另外，使用一套覆盖某个特定区域的不同探针，并进行任意一种荧光（红或绿）标记，当杂交在线性 DNA 分子时，探针系列将呈现出多色，红色、绿色、黄色（以绿色和红色标记的克隆重叠）图谱状的条形码，而小间隙仍为黑色（图 1A、B 和 F）。每一个克隆重叠群，如每一个条形码都是某个区域所特有的。这种多色的条形码的有效使用使得新探针快速可视地进行物理定位并分析患者样品的 DNA 重排。提供了一种快速可视化的鉴定方法。

1.2 纤维 FISH 的一些应用

纤维 FISH 应用于 DNA 克隆的物理定位，通过与目标区域已知克隆的比较，可以快速分析新克隆的大小、位置和方向[5,8]。该方法已用于人类基因组计划。通过采用覆盖所有假定外显子和内含子的探针与 cDNA 克隆杂交，纤维 FISH 也用于定位基因的基因组结构[9]。这种方法可以检测小到 500bp 的片段。使用纤维 FISH 条形码，可以很方便的对临床样品中发生在同一遗传条形码内的各种遗传学异常进行物理定位，如缺失、插入、长度多态性和易位。例如，Florijn 等[5]第一个使用纤维 FISH 定位了 2 个杜氏肌营养不良症（Duchenne dys-

trophy）缺失断裂点，其精确度为1～2kb。我们曾将我们的纤维FISH程序用于某6p21.3染色体*HLA*基因表达下调的B淋巴细胞瘤亚型[10]。除了证实了几种长度多态性以外，该研究还揭示大小在50～150kb的纯合性缺失。该研究使我们能够快速缩小缺失的范围。当使用一套覆盖免疫球蛋白重链位点恒定区特异的探针，可以观察到大量的多态性和体细胞类型转换重组事件[11]。在DNA扩增的情况下，纤维FISH可以确定大量的扩增子、簇内每个扩增片段的方向、每个扩增子的大小、不同细胞之间的变化和中度重复序列的拷贝数[12]。纤维FISH还用于研究哺乳细胞基因组中的病毒插入[13]。在含有t(11∶14)的套细胞淋巴瘤中使用覆盖断裂点区域的克隆重叠群纤维FISH，可检测含有t(14∶18)的滤泡性淋巴瘤和含有位于11q23上MLL断裂点的ALL/AML，断裂点的位置可精确确定于几个kb[14～16]。

目前，纤维FISH不用于常规诊断以检测临床样品的遗传学异常，因为它相对费时而且常常只能使用新鲜或冻存的细胞或组织。成功率（如获得有效纤维以得出可靠结论的病例数量）也不是100%，而且依赖于许多实验条件。这就意味着在有些实验不得不重复或者条件不得不调整以适应特殊的细胞材料。然而，根据我们的经验，纤维FISH作为一种研究工具，在设计优化探针组合以间期FISH检测所有异常方面做出了必要的贡献[17]。纤维FISH分析分别具有t(11∶14)易位和t(14∶18)易位特征的套细胞淋巴瘤和滤泡性淋巴瘤可以作为一个例证。纤维FISH对许多断裂点的定位表明这些断裂点分散在一个350～500kb的区域范围，这样大的区域范围已经不能使用常规的方法如PCR和Southern杂交来进行分析。纤维FISH定位可以清楚地确定可分析的断裂点区域的最大范围。纤维FISH也揭示了相当数量的病例（大约20%）中存在不常见复杂单等位基因断裂点，包括11q13上的细胞周期蛋白D或18q21上的BCL 2的单等位基因3′端和5′端的双断裂点，包括或者不包括在IgH位点的插入[18]或者细胞周期蛋白D的末端重复序列的小缺失[19]。基于这些资料，我们设计了位于所有可能断裂点侧翼的探针组合，在常规诊断中用于间期FISH检测[14,15]。

2. 材料

2.1 用晕圈方法制备DNA纤维

1. 培养细胞悬液，或者45μm冰冻的软组织/肿瘤切片或者分离的外周血淋巴细胞。

2. PBS：8g NaCl、0.29g KCl、1.449g Na_2HPO_4、0.249g KH_2PO_4，加水至1L。

3. 微型离心机。

4. 晕圈溶液：

a. 晕圈溶液 1：0.5% NP-40、25mmol/L Tris-HCl（pH 8.0）、10mmol/L $MgCl_2$ 和 0.5mmol/L $CaCl_2$。

b. 晕圈溶液 2：25mmol/L Tris-HCl（pH 8.0）、0.2mmol/L $MgCl_2$ 和 2mol/L NaCl。

c. 晕圈溶液 3：晕圈溶液 2 加入 4mg/100mL 碘化丙锭组成。

d. 晕圈溶液 4：25mmol/L Tris-HCl（pH 8.0），0.2mmol/L $MgCl_2$，0.2mol/L NaCl。

e. 晕圈溶液 5：25mmol/L Tris-HCl（pH 8.0），0.2mmol/L $MgCl_2$。

5. 添加 20% 牛血清白蛋白（BSA，A9647，Sigma，St. Louis，MO）的 PBS 溶液：10mL 无菌的 PBS 中溶解 2g BSA，分装后，−20℃保存。

6. Camag UV 盒 II，低压汞管（8 W），256nm 波长 UV 灯。

7. 用超纯水配制 10% SDS，以超纯水稀释到 0.05%（或者 0.1%）。

8. 乙醇：醚=1：1。

9. 76mm×26mm 有磨砂边的显微镜载玻片，浸入乙醇：乙醚=1：1 混合液中清洗，用无尘纸擦拭（见注释 1）。

10. 玻璃板，5mm 厚，放在碎冰上。

11. 胎牛血清（FCS）。

12. 荧光显微镜，配有 PL Fluotar 16 倍物镜和 PL Fluotar 100 倍物镜及观察德克萨斯红/PI 以及异硫氰酸荧光素（FITC）的滤光片。

2.2 探针标记

1. 探针 DNA（见注释 2）。

2. 10×切口缓冲液：0.5mol/L Tris-HCl（pH7.8）、50mmol/L $MgCl_2$、0.5mg/mL BSA。

3. 核苷酸混合物（0.5mmol/L dGTP、0.5mmol/L dATP、0.5mmol/L dCTP、0.1 mmol/L dTTP）。

4. 100mmol/L Bio-16-dUTP（Roche Diagnostics，Basel）或者 100mmol/L Dig-11-dUTP（Roche Diagnostics）。

5. 100mmol/L 二硫苏糖醇（DTT）。

6. 灭菌超纯水。

7. 二级纯度的 DNA 酶 I（Roche Diagnostics，104159，1mg/mL）。

8. DNA 聚合酶 I（M502A，10U/μL，Promega，Madison，WI）。

9. 酵母 RNA（10μg/μL，Sigma，R6750）。

10. 鲑鱼精 DNA（SS-DNA，10μg/μL，Sigma，D7290）。

11. 3mol/L NaAc pH 5.3～5.9。

12. 无水乙醇。

13. 16℃水浴。

14. 4℃，13 000r/min 离心机。

15. 1mL 杂交液：300μL 去离子甲酰胺、100μL 0.5mmol/L 磷酸钠缓冲液（pH 7.0）、100μL 20×SSC、500μL 超纯水、100mg 硫酸葡聚糖，70℃溶解 3h。

2.3 杂交

1. 载玻片电热恒温板。

2. 标记的黏粒/PAC/P1/BAC/YAC 探针。

3. Cot-1 DNA（Life Technologies，Gaithesburg，MD），乙醇沉淀，溶解于杂交液中至浓度为 3μg/mL。

4. 1mL 变性混合液：700μL 去离子甲酰胺、100μL 0.5mmol/L 磷酸钠缓冲液（pH 7.0）、100μL 20×SSC、100μL 超纯水。

5. 杂交混合液。

6. 无水乙醇。

7. 24mm×60mm 玻璃盖片。

8. 24mm×24mm 玻璃盖片。

2.4 杂交后免疫检测

1. 2×SSC。

2. 37℃水浴。

3. 100mL 染色缸。

4. TNT 溶液：0.1mmol/L Tris-HCl（pH 7.5）、0.15mol/L NaCl、0.05% Tween-20。

5. TNB 溶液：0.1mmol/L Tris-HCl（pH 7.5）和 0.15mol/L NaCl 配制的 0.5% Boehringer 封闭试剂。

6. 1.0mg/mL 德克萨斯红标记的链霉亲和素（Vector Laboratory，Burlingame，CA）。

7. 4.0mg/mL 鼠抗地高辛抗体（Sigma）。

8. 0.5mg/mL 生物素化山羊抗链霉亲和素抗体（Vector）。

9. 15.3mg/mL FITC 标记兔抗鼠抗体（Sigma）。

10. 1.5mg/mL FITC 标记山羊抗兔抗体（Vector）。

11. 抗淬灭复染液（Vectashield，Vector）。

12. 24mm×60mm 盖片。

3. 方法

3.1 制备含DNA纤维的载玻片标本

大多数类型的细胞，只要保持没有固定或干燥且细胞核完整，都适于做纤维FISH分析。冻存组织标本和沉淀的细胞团块，只要组织能重新悬起成细胞悬液，就还可以使用。有大量细胞质的细胞需要更剧烈的处理以使其裂解。一般情况下都是先采用最温和的方法，如果裂解不充分，就增加SDS的处理。

制备开始前，将下列物品放置在冰上：

1. 每种晕圈溶液和超纯水配制的0.05% SDS溶液分别放入100mL烧杯中，另外两个100mL烧杯分别装超纯水。

2. 一个试管装20% BSA，另一个试管装PBS。

3. 玻璃板（5mm厚）。

3.1.1 制备细胞悬液

适用于培养的细胞，外周血细胞或者其他细胞悬液：

1. 将1mL细胞悬液或胰酶消化的细胞（10 000～100 000个细胞）装在Eppendorf管中，用微量离心机离心数秒钟。

2. 弃上清。

3. 将细胞重悬于200μL PBS中（4℃）。

适用于冰冻组织：

1. 切一片或几片45μm厚度的冰冻组织片（见注释3）。

2. 装在Eppendorf管中，置于干冰上。

3. 使用前一直放置在干冰上。

4. 融化组织30s左右。

5. 加入大约500μL PBS（4℃）。

6. 剧烈上下抽吸碎组织片至形成悬液。

3.1.2 制备DNA纤维载玻片

1. 取20μL细胞于离心管中，加PBS（4℃）至47.5μL，加入2.5μL 20% BSA/PBS溶液，混合均匀。

2. 取上述悬液滴到标本上，用吸头将液体均匀的铺在整张载玻片上。

3. 将载玻片放置在冰冷的玻璃板上2min。

4. 将载玻片（磨砂边朝上）垂直立在纸上沥去多余的液体。

5. 用压缩空气缓慢风干直到片子边缘干燥（外周血细胞和培养细胞等容易裂解的细胞，可省略步骤6～9）（见注释4）。

6. 轻轻地将片子垂直浸泡在晕圈溶液1中30s。

7. 大约用3s时间从溶液中缓慢取出片子，然后用7s的时间用纸吸干多余的液体（见步骤4）。

8. 轻轻地将片子垂直浸泡在晕圈溶液2中30s。

9. 大约用3s时间缓慢取出片子，然后用7s的时间用纸吸干多余的液体（见步骤4）。

10. 轻轻地将片子垂直浸泡在晕圈溶液3中45s。

11. 大约用3s时间缓慢取出片子，然后用7s的时间用纸吸干多余的液体（见步骤4）。

12. 用纸擦净片子背面。

13. 将片子水平放置在在冰冷的玻璃板上。

14. 将湿片子放置在UV灯下，保持1～10cm的距离（见注释5）。

15. 立即用254nm波长照射1～10min（见注释6）。

16. 将片子垂直放置在纸上10s（见步骤4）。

17. 轻轻地将片子垂直浸泡在晕圈溶液4中30s。

18. 大约用3s时间缓慢取出片子，然后用7s的时间用纸吸干多余的液体（见步骤4）。

19. 轻轻地将片子垂直浸泡在晕圈溶液5中30s。

20. 用大约3s时间缓慢取出片子，然后用7s的时间用纸吸干多余的液体（见步骤4）。

21. 用超纯水洗2次。

22. 垂直将片子立在架子上使其干燥，室温放置数分钟。

23. 用荧光显微镜16倍物镜和TRITC滤光片（见注释6）观察片子以及检查是否（a）细胞适度裂解（图1C）（见注释7）；（b）细胞的数目足够（图1D）（见注释8）；（c）彗星状结构的（即纤维）数目足够（图1E）（见注释8）。

24. 杂交前放置在室温过夜干燥；要放在密闭的容器中－20℃可长期保存。

3.2 探针标记

1. 在离心管中配制以下混合物：5μL 10×切口缓冲液、5μL 0.1mol/L DTT、4μL核酸混合物、0.5μL已标记的核苷酸、1μg DNA，用超纯水调整体积至44μL。

2. 将混合物放置在冰上，加1μL DNA聚合酶。

3. 用冰冷的超纯水按1∶500/1∶1000/1∶2000梯度稀释DNase I储存液。

4. 加入 5μL 稀释的 DNase I。

5. 16℃孵育 2h。

6. 将反应体系放在冰上，取 5μL 用 2%琼脂糖凝胶检测片段大小（见注释 9）。

7. 加入 20μg ss DNA 和 20μg 酵母 RNA。

8. 加入 0.1 倍体积的 3mol/L NaAc 和 2.5 倍体积的－20℃无水乙醇沉淀 DNA。

9. 冰水混合物上放置 30min。

10. 用微量离心机以最大转速离心 30min，去掉乙醇并空气干燥沉淀物。

11. 用杂交混合液重悬探针，浓度为 30～60ng/μL，37℃溶解 30min，避光储存（4℃或－20℃）。

3.3 杂交

1. 将含有纤维的载玻片在 80℃玻片电热板上烤 2h（见注释 10）。

2. 制备探针混合物：每种标记的黏粒/PAC/P1 探针 3ng/μL 和每种探针加 50 倍过量的 Cot-1 DNA 并加杂交混合液至 10μL。

3. 探针混合物在 80℃变性 8min。

4. 冰上放置 2min 退火。

5. 混匀，以微量离心机稍离心。

6. 37℃水浴预复性探针 30min。

7. 将 120μL 变性混合液（70%去离子甲酰胺/2×SSC/50mmol/L 硫酸葡聚糖）加到 24mm×60mm 盖片上。

8. 将载玻片有纤维一面覆盖到盖片上，使变性混合液自然展开。

9. 翻转载玻片，使盖片一面朝上，将载玻片放在 80℃电热板上精确地加热 3min。

10. 轻轻倾斜载玻片，使盖片自然滑脱。

11. 冰上用 2×SSC（4℃）洗 2min。

12. 用 70%乙醇（－20℃）洗 5min。

13. 室温下依次用 90%、100%乙醇脱水。

14. 将标本垂直放置在架子上，气干。

15. 将 10μL 探针混合物加到载玻片上。

16. 盖上 24mm×24 mm 盖片。

17. 正面朝下于 37℃湿盒中杂交过夜。

3.4 杂交后洗脱和免疫检测

于 37℃水浴中预热 400mL 2×SSC：

1. 在盛有 37℃ 2×SSC 染色缸中浸泡 5min，使盖片自然滑落（见注释 11）。

2. 37℃下 2×SSC 中洗 3 次，每次 5min。

3. TNT 溶液中洗 5min。

4. 将 120μL TNB 溶液加到 24mm×60mm 盖片上，将片子有纤维的一面覆盖到盖片上。

5. 正面朝下于 37℃湿盒中孵育 20min。

6. 制备 1∶1000 鼠抗地高辛抗体和以 TNB 溶液稀释的 1∶100 德克萨斯红标记的链霉亲和素，每张载玻片 120μL。

7. 在 TNT 溶液中洗脱盖片。

8. 将抗体混合物加到 24mm×60mm 盖片上，反转载玻片覆盖到盖片上。

9. 正面朝下于 37℃湿盒中孵育 20min。

10. 在 TNT 溶液中洗脱盖片。

11. TNT 溶液洗 3 次，每次 5min。

12. 以 TNB 溶液配制 1∶1000 FITC 标记的兔抗鼠抗体和 1∶100 生物素化山羊抗链霉亲和素抗体，每张载玻片 120μL。

13. 将抗体混合物加到 24mm×60mm 盖片上，反转载玻片覆盖到盖片上。

14. 正面朝下于 37℃湿盒中孵育 30min。

15. 以 TNB 溶液配制 1∶100 FITC 标记的山羊抗兔抗体和 1∶200 德克萨斯红标记的链霉亲和素，每张载玻片 120μL。

16. 在 TNT 溶液中洗脱盖片。

17. TNT 溶液中洗 3 次，每次 5min。

18. 将抗体混合物加到 24mm×60mm 盖片上，反转载玻片覆盖到盖片上。

19. 正面朝下于 37℃湿盒中孵育 30min。

20. 在 TNT 溶液中洗脱盖片。

21. TNT 溶液中洗 3 次，每次 5min。

22. 依次用 70%、90%、100%乙醇系列脱水。

23. 空气干燥。

24. 加 10μL 抗淬灭剂到载玻片上，盖上 24mm×60mm 盖片。

3.5 信号观察与结果判读

载玻片上的背景非常高是由于探针的片段太长，然而，这种背景是很容易与

线性排列的串珠状纤维区分开（图 1E）。根据 Vaandrager 等的方法对 FISH 信号进行分析[11]。已知的探针间距离和（或）探针长度（如通过限制酶酶切作图或脉冲场凝胶电泳所获得的）提供了内部的长度参照[14]。不同载玻片上 DNA 凝集程度的不同可以使用数字化图像的计算机辅助延伸和压缩加以消除，以达到正常条形码的全长。当出现诸如断裂导致的异常条形码时，来自于正常等位基因的正常条形码信号的存在可证实其杂交效率。定位断裂点所必需的全部纤维的数量依赖于最初细胞悬液中肿瘤细胞的数量。然而，通常通过测量 5 个正常与异常的条形码残基就可以准确定位断裂点[14]。

4. 注释

1. 尽管许多载玻片的表面处理都适合进行纤维 FISH，但就我们的经验来看，特殊的涂层处理是不必要的。

2. 建议采用柱子纯化探针 DNA 用于缺口平移，因为 DNase I 对很少量的苯酚、盐和 RNA 的污染非常敏感。

3. 可以将标本切成几片并于 −70℃保存至两个月。每次实验需要的切片数量依赖于裂解细胞所使用的条件，剧烈的裂解可从载玻片上脱落更多的细胞。

4. 使载玻片保持水平会有彩虹样水印产生。

5. UV 照射使 DNA 产生缺口。照射过量会产生小的 DNA 片段，这些片段会从片子上脱落；而照射剂量太小，将导致仅有很少信号的无效杂交。因此，每次在实验前经常确定适当的照射剂量事实非常重要的，采用从 1～10min 变换照射时间长度以及从 1～10cm 变换 UV 灯与载玻片之间的距离。也可以使用 Strata-linker 装置。切记在 UV 照射的全程需要对眼睛和皮肤采取适当的保护措施。

6. 不要盖盖玻片，也不要使用油。

7. 应该出现彗星状的结构（图 1E）。若细胞核仍呈亮红色球状，则表明裂解不充分（图 1C）。这种情况下需进行以下步骤：将载玻片慢慢垂直浸泡在 0.05% SDS 中 10～30s，沥尽过量液体，将载玻片在晕圈溶液 1 中浸泡 10s 后继续步骤 10。但是 SDS 常常造成固定在载玻片上的细胞脱少，这种情况下，也应该用更多的细胞或者使载玻片更干燥。载玻片越干燥，裂解就越困难，所以应注意标本不要太过干燥。

8. 当整张载玻片都出现彗星状的结构以及排列整齐时，表明纤维数量是足够的（图 1E）。如果载玻片呈云雾状，而且可见亮的晶体状物质，就表示细胞数量太高了，应该减少细胞的数量（图 1D）。如果整张载玻片完全是黑的（除了杂质），那么就应该在步骤 3 后检查细胞悬液，确认有细胞存在。如果在悬液中很容易观察到细胞，那就有可能裂解步骤时细胞脱落了，则应跳过步骤 5，直接在

步骤 6 中吹干载玻片，如可以完全吹干上半部，保留潮湿的下半部，然后用晕圈溶液 3 处理。如果采用上述步骤后细胞还是裂解不充分，那只有重新离心细胞悬液，弃上清后用 50～100μL FCS 重悬细胞并于－70℃冻存过夜，然后快速融化并从步骤 3.1.1 开始重做实验。

9. 探针用生物素和（或）者地高辛标记，理想的探针片段大小为 400～800bp。探针片段的大小可以采用标准的缺口平移程序通过调整 DNase I 的用量加以控制。可用 2%琼脂糖凝胶电泳检查片段大小，并以生殖细胞纤维进行检测。标记后，沉淀探针并溶于杂交混合液中，可以同时混合多个探针而不改变杂交条件。

10. 室温下干燥过夜或者经－20℃保存的载玻片都可以使用。

11. 任何时候都不要使用外力剥离盖玻片，应该在染色缸中浸泡自然脱离。

致谢

非常感谢 Berna Beverloo 提供的 EVT6 基因区域黏粒探针重叠群和具有 EVT6 断裂点的细胞。这项工作部分受到荷兰肿瘤协会的 NKB-UL-99-1997 和 NKB-KUN-99-1912 项目以及 Cohen 研究所 IRS6. 3. 4 的 IRS/J.A. 项目的资助。

（黄　英译，曾　瑄校）

参考文献

1. Heng, H. H. and Tsui, L. C. (1998) High resolution free chromatin/DNA fiber fluorescent *in situ* hybridization. *J. Chromatogr. A* **806,** 219–229.
2. Bensimon, A., Simon, A., Chiffaudel, A., Croquette, V., Heslot, F., and Bensimon, D. (1994) Alignment and sensitive detection of DNA by a moving interface. *Science* **265,** 2096–2098.
3. Heiskanen, M., Kallioniemi, O., and Palotie, A. (1996) Fiber-FISH: experiences and a refined protocol *Genet. Anal.* **12,** 179–184. multicolor DNA fiber fluorescence *in situ* hybridization. *Blood* **88,** 1177–1182.
4. Wiegant, J., Kalle, W., Mullenders, L., et al. (1992) High-resolution *in situ* hybridization using DNA halo preparations. *Hum. Mol. Genet.* **1,** 587–591.
5. Florijn, R. J., Bonden, L. A., Vrolijk, H., et al. (1995) High-resolution DNA Fiber-FISH for genomic DNA mapping and colour bar- coding of large genes. *Hum. Mol. Genet.* **4,** 831–836.
6. Heng, H. H., Squire, J., and Tsui, L. C. (1992) High-resolution mapping of mammalian genes by *in situ* hybridization to free chromatin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89,** 9509–9513.
7. Parra, I. and Windle, B. (1993) High resolution visual mapping of stretched DNA by fluorescent hybridization. *Nat. Genet.* **5,** 17–21.
8. Inazawa, J., Ariyama, T., Tokino, T., Tanigami, A., Nakamura, Y., and Abe, T. (1994) High resolution ordering of DNA markers by multi-color fluorescent *in situ* hybridization of prophase chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* **65,** 130–135.
9. Florijn, R. J., van de Rijke, F. M., Vrolijk, H., et al. (1996) Exon mapping by fiber-FISH or LR-PCR. *Genomics* **15,** 277–282.

10. Riemersma, S. A., Jordanova, E. S., Schop, R. F., et al. (2000) Extensive genetic alterations of the HLA region, including homozygous deletions of *HLA class II* genes in B-cell lymphomas arising in immune- privileged sites. *Blood* **96,** 3569–3577.
11. Vaandrager, J. W., Schuuring, E., Kluin-Nelemans, H. C., et al. (1998) DNA fiber fluorescence *in situ* hybridization analysis of immunoglobulin class switching in B-cell neoplasia: aberrant CH gene rearrangements in follicle center-cell lymphoma. *Blood* **92,** 2871–2878.
12. Shiels, C., Coutelle, C., and Huxley, C. (1997) Analysis of ribosomal and alphoid repetitive DNA by fiber-FISH. *Cytogenet. Cell Genet.* **76,** 20–22.
13. Lestou, V. S., Strehl, S., Lion, T., Gadner, H., and Ambros, P. F. (1996) High-resolution FISH of the entire integrated Epstein-Barr virus genome on extended human DNA. *Cytogenet. Cell Genet.* **74,** 211–217.
14. Vaandrager, J. W., Schuuring, E., Zwikstra, E., et al. (1996) Direct visualization of dispersed 11q13 chromosomal translocations in mantle cell lymphoma by genome for high-resolution studies. *Blood* **88,** 1172–1182.
15. Vaandrager, J. W., Schuuring, E., Raap, T., Philippo, K., Kleiverda, K., and Kluin, P. (2000) Interphase FISH detection of BCL2 rearrangement in follicular lymphoma using breakpoint-flanking probes. *Genes Chromosomes. Cancer* **27,** 85–94.
16. Von Bergh, A., Emanuel, B., Zelderen-Bhola, S., et al. (2000) A DNA probe combination for improved detection of MLL/11q23 breakpoints by double-color interphase-FISH in acute leukemias. *Genes Chromosomes Cancer* **28,** 14–22.
17. Kluin, Ph. M., Vaandrager, J. W., van Krieken, J. H. J. M., and Schuuring, E. (1996) Chromosomal markers in lymphoma diagnosis. *Curr. Diagn. Pathol.* **3,** 187–199.
18. Vaandrager, J. W., Schuuring, E., Philippo, K., and Kluin, P. M. (2000) V(D)J recombinase-mediated transposition of the *BCL2* gene to the IGH locus in follicular lymphoma. *Blood* **96,** 1947–1952.
19. De Boer, C. J., Vaandrager, J. W., v. Krieken, J. H. J. M., Holmes, Z., Kluin Ph. M., and Schuuring, E. (1997) Visualization of mono-allelic chromosomal aberrations 3' and 5' of the cyclin *D1* gene in mantle cell lymphoma using DNA fiber fluorescence *in situ* hybridization. *Oncogene* **15,** 1599–1603.
20. Von Bergh, A., Gargallo, P., De Prijck, B., et al. (2001) Cryptic t(4;11) encoding *MLL-AF4* due to insertion of 5' *MLL* sequences in chromosome 4. *Leukemia* **15,** 595–600.

第 12 章　多重端粒荧光原位杂交

Samantha J. L. Knight, Jonathan Flint

1. 引言

分辨率为 400～550 条带的细胞遗传学分析方法是检测患者疑似染色体重排的标准方法，但不能用于小于 5Mb 片段重排的常规检测，稍大些的异常如果出现在条带特征变化不明显的位置，则可能被忽略掉。将来很可能由可以检测全基因组亚显微水平染色体重排的高分辨率芯片技术解决此问题。但是在芯片技术得到普及前，只有集中分析特殊染色体区域，如染色体的末端（端粒），提高分析的可靠性和分辨率。

用端粒筛查染色体重排有几点优势：第一，大部分易位涉及染色体末端，因此，不论易位片段的大小，靶序列为端粒的分析可以使发现易位的灵敏度达到 100%。第二，端粒的相邻区域是基因富含区，涉及这些区域的重排将比基因组其他区域更可能导致表型改变[1]。第三，包含端粒区域的染色体重排是导致人类遗传疾病的重要原因[2～7]，如 Wolf-Hirschorn 综合征（染色体 4p）、猫叫综合征（染色体 5p）、Miller-Dieker 综合征（染色体 17p）、伴有智力迟钝的 α-地中海贫血症（ATR-6，染色体 16p）均由亚端粒区域易位造成的不平衡产物引起。

直到现在，涉及端粒区重排的检测仍然存在问题，一方面是由于染色体末端的序列结构的复杂性[8～13]；另一方面是设计兼有高灵敏度、特异性和非常经济的端粒检测方法的技术难题。目前两种技术难题已被阐述，用端粒特异性探针检测微小重排的多重端粒 FISH 方法已经建立。本章介绍的多重端粒 FISH 技术是 Cytocell 公司开发的 Chromoprobe Multiprobe®-T 系统，该系统使用划分为 24 个方形区的显微载玻片和功能为盖玻片的 24 个方形突出块的 Multiprobe® 装置[14]。该系统可以同时处理 24 个双色（48 个）杂交反应，因此所有端粒的检测可以在一张片子上完成。整个实验程序如图 1 所示，简单地说首先将固定的患者染色体细胞悬液在显微载玻片的每个方形区上滴一滴，再加入相应标记的端粒探针，将片子与 Multiprobe 装置组成三明治的结构。其次，探针和染色体 DNA 在电热恒温板上同时变性并杂交过夜；第三，杂交后洗脱、荧光显微镜观察杂交结果，计算每个端粒特异性探针信号的数目，对可能发生重排的染色体进行分析。进一步的分析可采用一些市售的已标记端粒特异性探针，或者购买用甘油保存的端粒特异性克隆，自己制备和标记探针。

Chromoprobe Multiprobe®-T 系统被广泛用于原发性智力障碍患者的微小亚

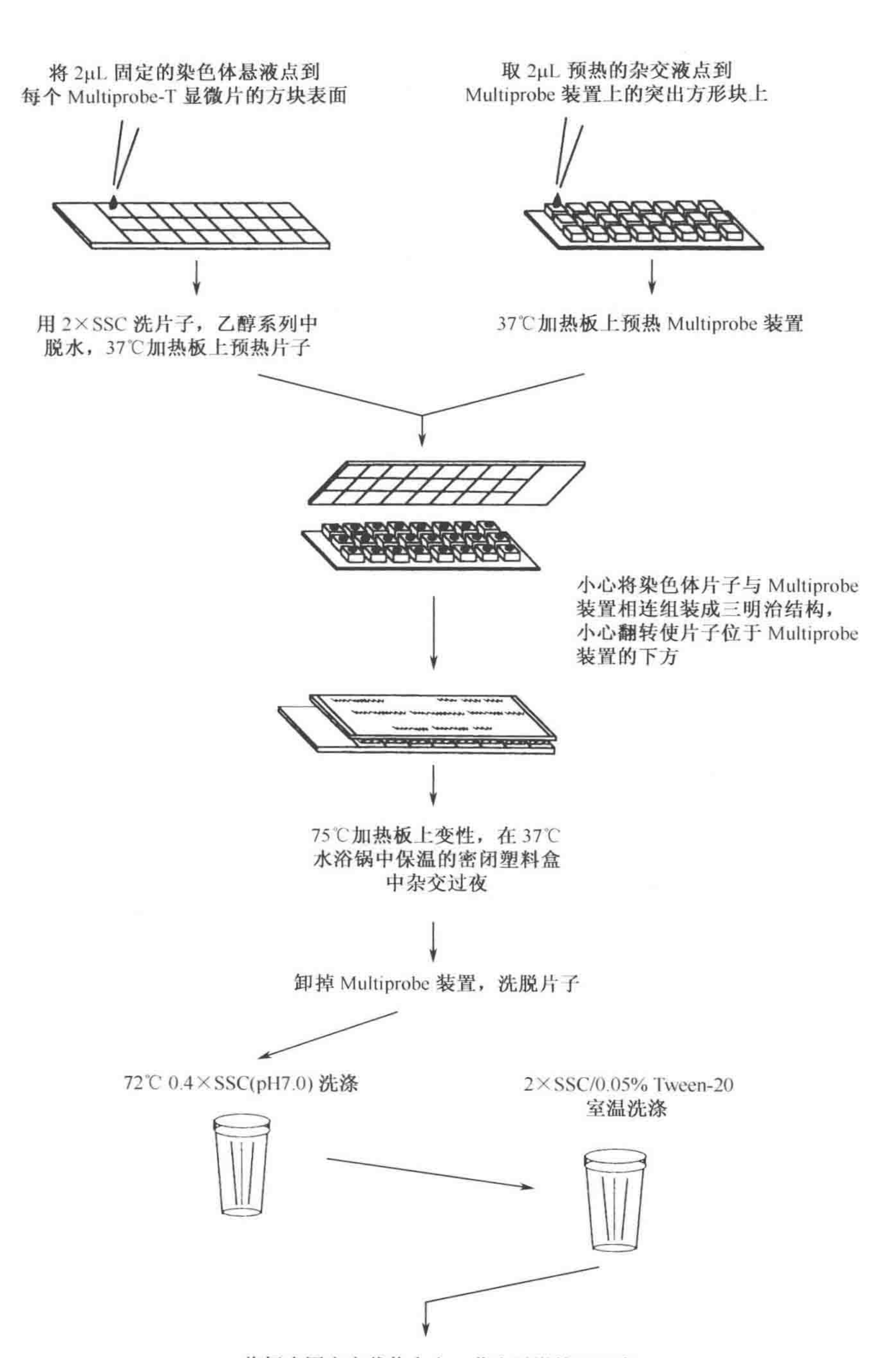


图 1　Chromoprobe Multiprobe®-T 系统实验流程图。

端粒重排的检测中。目前该系统使用的探针主要是来自第二代端粒克隆的 PAC 探针[表1(b)]。系统最早使用的是第一代端粒克隆，主要由黏粒探针和少量的 PAC 和 P1 探针组成[表1(a)]。Knight 等使用第一代克隆证明亚端粒重排是造成智力障碍的重要原因，占有中度乃至重度发育迟缓和异常面容个体的 7.4%，约有一半的病例有阳性家族史[25]，这些结论已被许多病例报告所证明[26~34]，根据患者智障程度区分患者的更多研究也证明了这些结论。另外，许多大型研究表明亚端粒异常发生的频率在 2.2%～9%，但是这些研究中选择病例的标准是多种多样的[44~48]。

表 1（a） 第一代端粒克隆

端粒	克隆号	出处[a]	克隆类型[b]
1p	CEB108[d]	ATCC	黏粒[16]
1p	GS-13-P11	Incyte	PAC
1q	112N326Q6	ICRF	黏粒
1q	2123. 2a1	ATCC	黏粒[14]
2p	GS-68-13	Incyte	PAC
2p	2052f6	ATCC	黏粒
2q	210-E14	DuPont/ Incyte	PI
2q	2112b2	ATCC	黏粒
3p	B47a2，AT-B47b2	ATCC	黏粒[14]
3q	B35c1	ATCC	黏粒
4p	B31	ATCC	黏粒[17]
4q	cT55	ATCC	黏粒[18]
5p	84c11	ATCC	黏粒
5q	B22a4	ATCC	黏粒
6p	GS-36-12	Incyte	PAC
6q	2158e3	ATCC	黏粒
7p	109a6[4]	ATCC	黏粒
7q	3	OA	黏粒[19]
7q	2000a5[d]	ATCC	黏粒
8p	GS-63-M14	Incyte	PAC
8q	2205a2	ATCC	黏粒
8q	129A5	LANL	黏粒
8q	2053b3	ATCC	黏粒
9p	34-H2	Incyte	PAC
9q	2241C1	ATCC	黏粒[14]
10p	2189B6	ATCC	黏粒
10q	2136a1	ATCC	黏粒[14]
11p	2209a2	ATCC	黏粒
11p	146C2	LLNL	黏粒

续表

端粒	克隆号	出处[a]	克隆类型[b]
11q	161D7	LLNL	黏粒
11q	2072c1	ATCC	黏粒
12p	GS-90-15	Incyte	PAC
12q	GS-221-K18	Incyte	PAC
12q	2196b2	ATCC	黏粒
13q	85-A10	DuPont	PI
13q	2202e1	ATCC	黏粒
14q	60-H4	DuPont	PI
14q	2006a1	ATCC	黏粒
15q	GS-154-P1	Incyte	PAC
16p	GS-119-L6	Incyte	PAC
16p	cGG4	ATCC	黏粒
16q	D3b1	ATCC	黏粒
17p	2111b1	ATCC	黏粒[14]
17q	111D9	LYNL	黏粒
17q	B37c1	ATCC	黏粒
18p	GS-52-M11	Incyte	PI
18q	127B6	LYNL	黏粒
18q	2050a6	ATCC	黏粒
19p	F20643	LYNL	黏粒
19q	F21283[d]	LYNL	黏粒
20p	THY7	OA	黏粒
20p	2005a4	ATCC	黏粒
20q	GS-204-A16	Incyte	PAC[14]
21q	2H14	DuPont/Incyte	PI
21q	C9a1	ATCC	黏粒
22q	106G1220	ICRF	黏粒[20]
22q	N85A3	ATCC/ICRF	黏粒[21]
XpYp	CY29	ATCC	黏粒[22]
XqYq	C8.2/1[d]	ATCC	黏粒[23]

表 1（b） 第二代端粒克隆

端粒	克隆号	出处[a]	克隆类型[c]
1p	GS-62-L8	Incyte	PAC
1p	GS-232-B23[d]	Incyte	BAC
1q	GS-160-H23	Incyte	PAC

续表

端粒	克隆号	出处[a]	克隆类型[c]
1q	GS-167-K11	Incyte	BAC
2p	GS-892-G20[d]	Incyte	PAC
2p	GS-8-L3	Incyte	BAC
2q	GS-1011-O17[d]	Incyte	PAC
2q	RG-172-I13	RGI	BAC
3p	GS-1186-B18[d]	Incyte	PAC
3p	RG-228-K22	RGI	BAC
3q	GS-196-F4[d]	Incyte	PAC
3q	GS-56-H22	Incyte	BAC
4p	GS-36-P21[d]	Incyte	PAC
4p	GS-118-B13	Incyte	BAC
4q	GS-963-K6[d]	Incyte	PAC
4q	GS-31-J3	Incyte	BAC
5p	GS-189-N21[d]	Incyte	PAC
5p	GS-24-H17	Incyte	PAC
5q	GS-240-G13[d]	Incyte	PAC
6p	GS-62-I11[d]	Incyte	PAC
6p	GS-196-I5	Incyte	BAC
6q	GS-57-H24[d]	Incyte	PAC
7p	GS-164-D18	Incyte	PAC
7q	GS-3K-23	Incyte	PAC
8p	GS-580-L5[d]	Incyte	PAC
8p	GS-77-L23	Incyte	BAC
8q	GS-489-D14[d]	Incyte	PAC
8q	GS-261-I1	Incyte	BAC
9p	GS-43-N6[d]	Incyte	PAC
9p	RG-41-L13	Incyte	BAC
9q	GS-112-N13[d]	Incyte	PAC
9q	GS-135-I17	Incyte	BAC
10p	GS-306-F7[d]	Incyte	PAC
10p	GS-23-B11	Incyte	BAC
10q	GS-137-E24[d]	Incyte	PAC
10q	GS-261-B16	Incyte	BAC
11p	GS-908-H22[d]	Incyte	PAC
11p	GS-44-H16	Incyte	PAC
11q	GS-770-G7[d]	Incyte	PAC

续表

端粒	克隆号	出处[a]	克隆类型[c]
11q	GS-26-N8	Incyte	PAC
12p	GS-496-A11[d]	Incyte	PAC
12p	GS-8-M16	Incyte	BAC
12q	GS-124-K20	Incyte	BAC
12q	GS-221-K18[d]	Incyte	PAC
13q	GS-163-C9[d]	Incyte	PAC
13q	GS-1-L16	Incyte	PAC
14q	GS-820-M16[d]	Incyte	PAC
14q	GS-200-D12	Incyte	BAC
15q	GS-124-O5[d]	Incyte	PAC
15q	GS-154-P1[d]	Incyte	PAC
16p	GS-121-I4[d]	Incyte	PAC
16p	RG-191-K2	RGI	BAC
16q	GS-240-G10[d]	Incyte	PAC
16q	GS-191-P24	Incyte	PAC
17p	GS-202-L17[d]	Incyte	PAC
17p	GS-68-F18	Incyte	BAC
17q	GS-362-K4[d]	Incyte	PAC
17q	GS-50-C4	Incyte	BAC
18p	GS-52-M11	Incyte	P1
18p	GS-74-G18[d]	Incyte	BAC
18q	GS-964-M9[d]	Incyte	PAC
18q	GS-75-F20	Incyte	BAC
19p	GS-546-C1[d]	Incyte	PAC
19p	RG-129-F16	RGI	BAC
19q	GS-48-O23	Incyte	PAC
19q	GS-325-I23	Incyte	BAC
20p	GS-1061-L1[d]	Incyte	PAC
20p	GS-82-O2	Incyte	PAC
20q	GS-81-F12[d]	Incyte	PAC
21q	GS-63-H24[d]	Incyte	P1
21q	GS-2-H14[d]	Incyte	PAC
22q	GS-99-K24[d]	Incyte	PAC
22q	CTD-3018-K24[d]	Incyte	BAC
XpYp	GS-98-C4	Incyte	PAC
XpYp	RPCI-11-839-D20[d]	BacPac	BAC

续表

端粒	克隆号	出处[a]	克隆类型[c]
XqYq	GS-225-F6	Incyte	BAC
Xq	GS-202-M24	Incyte	PAC

a 克隆可以从以下机构或保藏中心获得，ATCC（美国典型培养物保藏中心），Incyte(http://www.incyte.com)，ICRF（分子遗传学参考文库数据库，帝国肿瘤研究基金 MPI），DuPont（Du pont 默克制药公司人类 Foreskin 成纤维母细胞 PI 实验室 1），LANL（Los Alamos 国家图书馆），LLNL（Laurence Livermore 国家图书馆），RGI（Research Genetics 公司），Bacpac 网站（http://bacpac.med.buffalo.edu/human/overview.html）。这些机构或保藏中心仅向原作者、以研究为目的使用者或者人类基因组作图计划资源中心(http://www.hgmp.mrc.ac.uk)的注册用户提供。

b 除了注明出处的克隆外，其他克隆均来自 NIH 和分子医药联合研究所（Institute of Molecular Medicine Collaboration)[15]。

c 全部克隆由 Knight 和 Lese 等提供[24]。

d Cytocell 公司的 Chromoprobe Multiprobe®-T 系统使用的克隆。

de Vires 等试图通过对比大量发育迟缓的个体与已证实端粒完整的正常个体之间临床指征的差异，来精细确定哪些个体有可能发生亚端粒重排[49]，结果表明产前发育迟缓和有发育迟缓家族病史的个体是存在亚端粒异常问题的指征。除了提示有染色体表型的面貌特征外，这些临床标准都被包含在 5 个项目临床检查量表中，de Vries 等指出该量表将有助于提高发育迟缓个体中的亚端粒重排的临床检出率[49]。

Chromoprobe Multiprobe®-T 系统最初是用于发育迟缓的研究，成为发育迟缓病例新的诊断手段，目前被证实对其他临床应用也同样重要[50]。例如，越来越多的研究表明分析端粒完整性可以完全确定患者的核型[51~54]；在这些病例中，诊断实验室以前已发现异常的核型，但是由于这种标准核型分析的分辨率较低不足以排除亚显微重排的存在。多重端粒 FISH 技术也可用来分析恶性血液病变的复杂核型[55~58]，进一步可用于自发习惯性流产以及不育的诊断[26,59]。当我们获得可能涉及某些端粒区域重排的信息时，可以使用该端粒特异性探针来检测，例如，对选择的病例可以用单个染色体端粒特异性探针对分裂阶段的胚胎进行植入前诊断来提供信息[60~62]。

Multiprobe® 端粒检测技术的主要目的是提高诊断能力，为家庭提供更准确的信息、更加准确的遗传咨询、更加完善的治疗和预防策略。目前至少存在另外 5 种检测端粒完整性的技术方法：①端粒芯片[63]；②比较基因组杂交[64]；③短串联重复多态性扫描[65~67]；④使用可扩增性片段探针杂交测定位点拷贝数[68,69]；⑤多重 FISH 或多色 FISH（M-TEL)[70~72]。目前有两种商业化系统可用于人类所有端粒的分析，它们是 Cytocell 公司开发的 Chromoprobe Multiprobe®-T 系统和 Vysis 公司的 Totel Vysion Multicolor FISH Probe Panel 系统。

其中第一种系统在临床诊断实验室中被广泛使用。本章详细介绍了这种系统的方法学和常见问题的解决方案，本章还提供了自行制备和使用一套间接标记 FISH 端粒探针所需的材料和方法。

2. 材料

2.1 固定的染色体细胞悬液的制备

1. 1～5mL 外周血样品或者 25mL 指数增长的永生化淋巴细胞株（见注释 1）。
2. 二级细胞培养用超净台（如 BioMAT-2，Envair Ltd.，Rossendale，UK）。
3. T25 和 T75 细胞培养瓶（Corning Inc.，New York，USA）。
4. Nunc 管（Gibco-BRL，Paisley，UK）。
5. RPMI 1640 培养基：含 $NaHCO_3$、不含谷氨酰胺（Sigma，Poole，UK）。
6. 青霉素（500U/mL）/链霉素(5000μg/mL)(Gibco-BRL，Paisley，UK)。
7. 200mmol/L L-谷氨酰胺（Gibco-BRL，Paisley，UK）。
8. 胎牛血清（FCS）(Globepharm)。
9. M 型植物血球凝集素（PHA-M）(Gibco-BRL，Paisley，UK)。
10. 胸苷（Sigma，Poole，UK）。
11. 10mg/mL KaryoMax 秋水酰胺溶液（Gibco-BRL，Paisley，UK）。
12. KCl（Sigma，Poole，UK）。
13. 甲醇，分析纯（BDH Laboratory Supplies，Poole，UK）。
14. 冰乙酸（BDH Laboratory Supplies，Poole，UK）。

2.2 Chromoprobe Multiprobe®-T 系统杂交和杂交后处理（Cytocell 公司）

1. 相差显微镜（Olympus BX40，Olympus Optical Co. Ltd.，UK）。
2. 塑料或者玻璃染色缸（Raymond Lamb Inc.，Eastbourne，UK）。
3. 两个平面的加热板（如 Cytocell 公司的电热恒温板）。
4. 装有 Pinkel 滤光片轮的 CCD 显微镜，包括 DAPI、德克萨斯红、FITC 滤光片的双色或三色滤光片（Olympus BX60，Olympus Optical Co. Ltd.，UK）。
5. 荧光显微镜专用镜油（Carl Zeiss Ltd.，Welwyn Garden City，UK）。
6. 固定的染色体悬液。
7. 高质量（super premium）显微载玻片（BDH Laboratory Supplies，Poole，UK）。

8. Chromoprobe Multiprobe®-T 试剂盒（Cytocell Ltd）。

9. 固定液：甲醇∶冰乙酸（3∶1）。

10. 20×SSC：3mol/L NaCl（Sigma，Poole，UK），0.3mol/L 柠檬酸钠（Sigma，Poole，UK）。

11. 洗脱液 I：0.4×SSC。

12. 洗脱液 II：2×SSC、0.05% Tween-20（BDH Laboratory Supplies，Poole，UK）。

13. 指甲油。

2.3 端粒克隆 DNA 的抽提

1. 恒温摇床（如 G24，New Brunswick Scientific Co. Inc.，Edison，NJ）。

2. 真空微型离心机（如 DNA Speed Vac DNA 120，Savant Instruments Inc.，Farmingdale，USA）。

3. 甘油冻存管或穿刺管保存的端粒克隆（见表 1 查阅获得途径）。

4. 氨苄青霉素（Sigma，Poole，UK）。

5. 卡那霉素（Sigma，Poole，UK）。

6. 氯霉素（Sigma，Poole，UK）。

7. LB 琼脂平板：1%（*m*/*V*）NaCl（Sigma，Poole，UK）、1%（*m*/*V*）蛋白胨（Difco Labs，Michigan，USA）、0.5%（*m*/*V*）酵母提取物（Difco Labs，Michigan，USA）、1.5%（*m*/*V*）琼脂粉（Difco Labs，Michigan，USA）和适宜的抗菌素（50μg/mL 氨苄、12.5μg/mL 氯霉素或 35μg/mL 卡那霉素）。

8. 2×YT 培养基：1.6%（*m*/*V*）蛋白胨（Difco Labs，Michigan，USA）、1%（*m*/*V*）酵母提取物（Difco Labs，Michigan，USA）、0.5%（*m*/*V*）NaCl（Sigma，Poole，UK）。

9. 甘油（Sigma，Poole，UK）。

10. 有橙色螺旋帽的 250mL 离心管（Corning Inc.，New York，USA）。

11. 细胞重悬液：1%葡萄糖（过滤除菌），10mmol/L EDTA，25mmol/L Tris-HCl，pH 7.4。

12. 细胞裂解液：0.2mol/L NaOH（Sigma，Poole，UK），1% SDS。

13. 中和液：3mol/L 乙酸钾（Sigma，Poole，UK）、11.5%（*m*/*V*）冰乙酸（BDH Laboratory Supplies，Poole，UK）。

14. 塑料漏斗（BDH Laboratory Supplies，Poole，UK）。

15. 网筛（Hybaid Ltd.，Ashford，UK）。

16. 异丙醇，分析纯（BDH Laboratory Supplies，Poole，UK）。

17. 乙醇，分析纯（BDH Laboratory Supplies，Poole，UK）。

18. TE 缓冲液：10mmol/L Tris-HCl，pH 8.0（Sigma，Poole，UK），1mmol/L EDTA（Sigma，Poole，UK）。

2.4 缺口平移法间接标记端粒克隆DNA

1. 1mmol/L 生物素-16-dUTP（Roche，Lewes，UK）。

2. 1mmol/L 地高辛-11- dUTP（Roche，Lewes，UK）。

3. 10×dNTP混合物：各0.5mmol/L的dATP /dGTP/dCTP；0.1mmol/L dTTP（100mmol/L储存液，Roche，Lewes，UK）。

4. 10×缺口平移缓冲液：0.5mol/L Tris-HCl pH 7.5，50mmol/L $MgCl_2$，0.5mg/mL 无核酸酶牛血清白蛋白，组分 V（Sigma，Poole，UK）。

5. 100mmol/L二硫苏糖醇（DTT）（Sigma，Poole，UK）。

6. 2.5ng/μL DNase I（Amersham Life Sciences Ltd.，Little Chalfont，UK）。

7. 10 000U/mL DNA 聚合酶 I（New England Biolabs，Hitchin，UK）。

8. 交联葡聚糖G50的SELECT™-B离心柱（5 Prime→3 Prime Inc.，Arapahoe Boulder，USA）。

9. 鲑鱼精子 DNA（2mg/mL储存液，超声波破碎至200～500bp）。

10. 1mg/mL 人 Cot-I DNA（Gibco-BRL，Paisley，UK）。

11. 甲酰胺（Fluka）。

12. 杂交液：65%甲酰胺、1×SSC、10%硫酸葡聚糖（相对分子质量500 000）（BDH Laboratory Supplies，Poole，UK）。

2.5 间接标记探针的杂交和杂交后处理

1. 高质量显微载玻片（BDH Laboratory Supplies，Poole，UK）。

2. 22mm×22mm 盖玻片（BDH Laboratory Supplies，Poole，UK）。

3. 避光塑料玻片盒（Raymond Lamb Inc.，Eastbourne，UK）。

4. 用封口膜自行裁制的 22mm×64mm 盖片（American National Cam. USA）。

5. 洗脱液 I：0.4×SSC。

6. 洗脱液 II：2×SSC、0.05% Tween-20（BDH Laboratory Supplies，Poole，UK）。

7. ST 缓冲液：4×SSC、0.05% Tween-20（BDH Laboratory Supplies，Poole，UK）。

8. BSA（组分 V）（Sigma，Poole，UK）。

9. 封闭液：含 3%（*m*/*V*）BSA 的 ST 缓冲液，用 0.45μm 滤膜过滤除菌（见注释 2）。

10. 双色检测用抗体溶液 1：1mL 封闭液，18μL FITC 标记的鼠抗地高辛抗体（Sigma，Poole，UK），0.65μL 德克萨斯红标记亲和素（Vector Laboratory，Peterborough，UK）（见注释 3）。

11. 地高辛检测用抗体溶液 1：1mL 封闭液，18μL FITC 标记的鼠抗地高辛抗体（Sigma，Poole，UK）。

12. 生物素检测用抗体溶液 1：1mL 封闭液，0.65μL 德克萨斯红标记亲和素（Vector Laboratory，Peterborough，UK）。

13. 双色检测用抗体溶液 2：1mL 封闭液，1.7μL FITC 标记的兔抗鼠抗体（Sigma，Poole，UK），7.5μL 生物素标记抗亲和素抗体（Vector Laboratory，Peterborough，UK）。

14. 地高辛检测用抗体溶液 2：1mL 封闭液，1.7μL FITC 标记的兔抗鼠抗体（Sigma，Poole，UK）。

15. 生物素检测用抗体溶液 2：1mL 封闭液，7.5μL 生物素标记抗亲和素抗体（Vector Laboratory，Peterborough，UK）。

16. 双色检测用抗体溶液 3：1mL 封闭液，1.7μL FITC 标记的山羊抗兔抗体（Sigma，Poole，UK），0.65μL 德克萨斯红标记亲和素（Vector Laboratory，Peterborough，UK）。

17. 地高辛检测用抗体溶液 3：1mL 封闭液，1.7μL FITC 标记的山羊抗兔抗体（Sigma，Poole，UK）。

18. 生物素检测用抗体溶液 3：1mL 封闭液，0.65μL 德克萨斯红标记亲和素（Vector Laboratory，Peterborough，UK）。

19. Vectashield 复染液（Vector Laboratory，Peterborough，UK）：复染液中包含 1.5μg/mL DAPI。

20. 指甲油。

3. 方法

3.1 固定的中期染色体细胞悬液的制备

3.1.1 外周血样品

1. 37℃水浴锅内预热 RPMI-1640 培养基、FCS、L-谷氨酰胺和青霉素/链霉素（见注释 4）。

2. 在二级细胞培养用超净台中，无菌条件下配制完全培养基：100mL FCS、5mL L-谷氨酰胺、5mL 青霉素/链霉素，加 RPMI-1640 至 500ml。

3. 在 2 个 Nunc 培养管中，各加 0.25mL 外周血、5mL 完全培养基、PHA (终浓度 2%)。

4. 37℃培养箱中孵育 72h。

5. 加 100μL 15mg/mL 的胸苷到每个培养物中，轻轻混匀。

6. 37℃培养箱中孵育 16～18h。

7. 180*g* 离心 5min。

8. 弃上清，用 5mL 完全培养重悬细胞。

9. 180*g* 离心 5min。

10. 弃上清，用 5mL 完全培养重悬细胞团块。

11. 37℃条件下孵育 5h。

12. 加 100μL 10μg/mL KaryoMax 秋水酰胺。

13. 37℃条件下孵育 10min。

14. 180*g* 离心 5min。

15. 弃上清，用 37℃预热的 7mL 0.075mol/L KCl 悬起细胞团块。

16. 37℃条件下孵育 15min。

17. 180*g* 离心 5min。

18. 弃上清。

19. 将管子放在涡旋振荡器上以中速振荡，缓慢滴加预冷的甲醇：冰乙酸(3：1)固定液到细胞中。当细胞悬液变成褐色时，加速滴加固定液，至总体积 5mL。

20. 180*g* 离心 5min，弃上清。

21. 加 5mL 预冷的固定液。

22. 180*g* 离心 5min，弃上清。

23. 加 5mL 预冷的固定液。

24. 180*g* 离心 5min，弃上清。

25. 加 3mL 预冷的固定液重悬细胞。

26. 储存在－20℃条件下备用。

3.1.2 来自永生化淋巴细胞株

1. 增殖细胞，直至全培基到 50mL。

2. 收获细胞前的 18～24h，更换新鲜培养液。

3. 收获时，将 20mL 生长良好的细胞移到 50mL 离心管中。

4. 加 200μL 浓度为 10μg/mL 秋水酰胺，轻轻混匀。

5. 37℃条件下孵育 50～60min (见注释 5)。

6. 180*g* 离心 5min。

7. 弃上清，用37℃预热的7mL 0.075mol/L KCl重悬细胞团块。

8. 37℃条件下孵育20min（见注释6）。

9. 180*g*离心5min，弃上清。

10. 将管子放在旋涡振荡器上以中速振荡，然后小心滴加预冷的甲醇∶冰乙酸（3∶1）固定液，总体积至2mL。

11. 再加13mL预冷的固定液。

12. 180*g*离心5min，弃上清。

13. 加15mL预冷的固定液。

14. 180*g*离心5min，弃上清。

15. 加15mL预冷的固定液。

16. 180*g*离心5min，弃上清。

17. 加1mL固定液重悬细胞。

18. 储存在－20℃备用。

3.2 使用Cytocell公司开发的Chromoprobe Multiprobe®-T系统杂交和杂交后处理（见注释7）

3.2.1 优化固定的细胞悬液浓度

1. 轻轻地将2μL细胞悬液滴加到干净的高质量显微载玻片上。

2. 待液滴干燥后，相差显微镜10倍物镜下观察。

3. 理想的分裂指数为5%（见注释8），中期分裂相中染色体之间应尽量少的出现交叉重叠（图2A）。

4. 如果细胞浓度太大，用预冷的固定液调整至合适的细胞浓度。

5. 如果细胞浓度太低，160*g*离心5min，弃上清，用固定液重悬细胞调整至合适的细胞浓度。

3.2.2 制备Multiprobe®-T显微标本

1. 将载玻片浸泡在100%甲醇中2min。

2. 用干净的软纸擦干片子。

3. 吸取2μL调整好浓度的染色体悬液加入到Multiprobe®-T显微载玻片的方形块表面，分4组按顺序加：（A）方形块1、19、5、X、17、3、21和7，放置干燥；（B）方形块2、20、6、Y、8、4、22和8，放置干燥；（C）方形块9、11、13和15，放置干燥；（D）方形块10、12、14和16，放置干燥。

4. 用相差显微镜观察每一点以确保不漏掉样品，保证每个方形块中有足够数目的能够分析的中期分裂相（见注释9）。

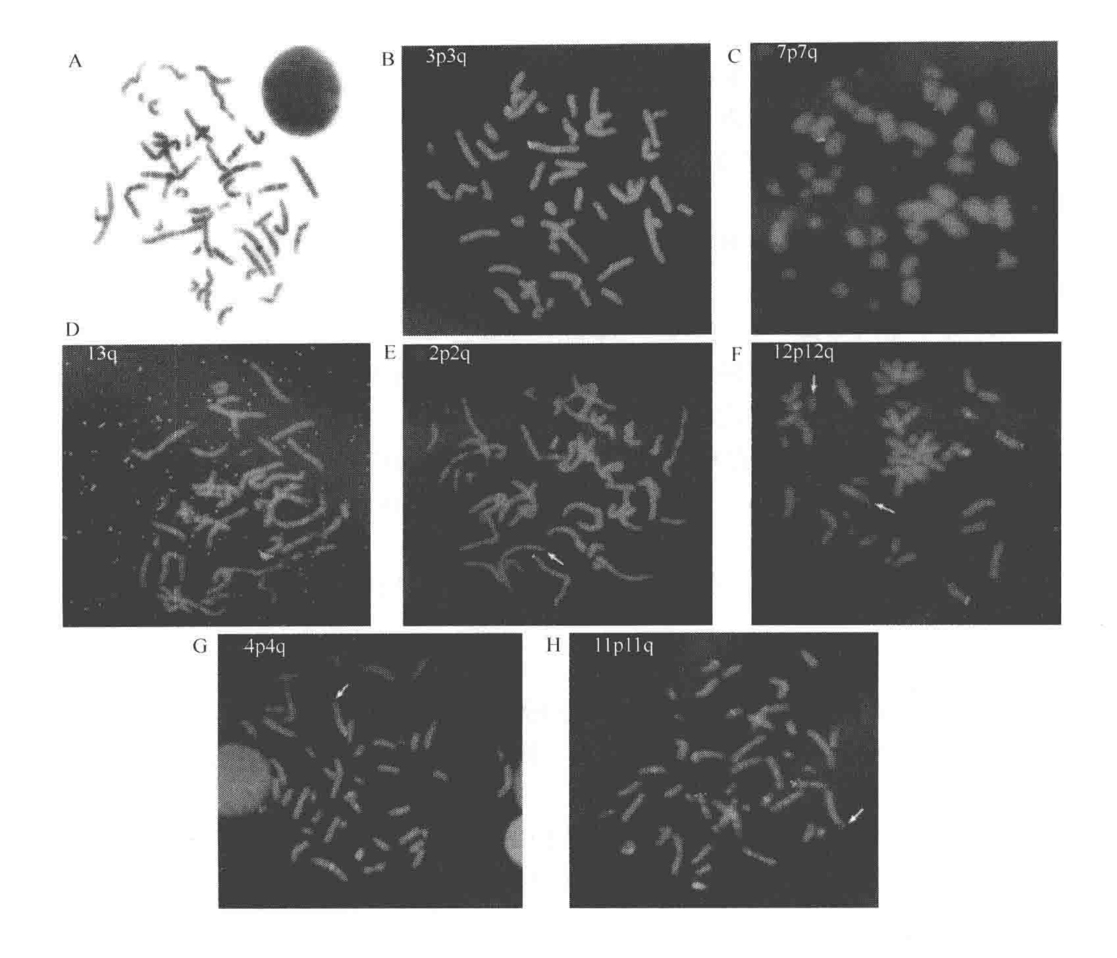


图 2 （A）一个适合杂交的中期染色体分散度图例；（B）用 3p3q 端粒特异性的 PAC 探针的正常杂交结果；（C）过度变性的染色体胀大形态，这张图中 7p 缺失很清楚；（D）片子上出现很多斑点是抗体用量过大的典型特征，洗脱不充分也可出现类似的外观；（E）2p2q 多态性，这张图上箭头所指 2q 上的信号几乎看不到；（F）12p 黏粒探针与 6p 和 20q 的亚端粒区域发生了交叉杂交；（G）和（H）在一个智力发育延迟个体的同一张片子上的方形块 4 和 11 杂交结果揭示出具有临床意义的非平衡易位（4p 单体与 11p 三体）。这些杂交图例中，短臂信号为红色，长臂信号为绿色。

3.2.3 杂交程序

1. 预温一块加热块板到 37℃，另一块预热至 75℃（见注释 10）。
2. 将 Chromoprobe Multiprobe® 杂交室放在 37℃水浴中。
3. 反复吹打混匀试剂盒中的杂交液。
4. 取 60μL 杂交液到新的 Eppendorf 管中，预热至 37℃（用加热板、恒温

箱或水浴箱）。

5. 预热 Multiprobe® 装置，探针面朝上（即突出表面朝上，标记表面朝下），不要接触突出方形块的表面。

6. 准备一个染色缸装 2×SSC，三个染色缸分别装 70%、85%和 100%的乙醇系列。

7. 用 2×SSC 洗点好样的片子 2min，然后依次在 70%、85%和 100%的乙醇中各脱水 2min。

8. 片子空气干燥后，有样品一面朝上的放在 37℃加热板上。

9. 同时，用 10μL 移液器取 2μL 预热杂交液点到 Multiprobe® 装置上的突出方形块上（放置在 37℃加热块上）。

10. 小心翻转片子（点样品面朝下），使之与 Multiprobe® 装置上相应的方块接触，组装到 Multiprobe® 装置上；也就是方块 1 在 Multiprobe® 装置的最右上角。

11. 小心地提起组装好的装置，翻转使片子在 Multiprobe® 装置的下面（见注释 11）。

12. 放在 37℃加热板上 10min。

13. 将组装好的装置保持水平小心地转移到 75℃加热板上。

14. 变性 1～3min，变性时间取决于固定的染色体悬液时间长短（见注释 12）。

15. 立即转移组装好的装置到预热的 Chromoprobe Multiprobe® 杂交室（或者避光塑料玻片盒）中，更换盖子，然后在去盖的水浴锅中过夜。

3.2.4 杂交后洗脱和封片

1. 将洗脱液 I 倒入干净的染色缸中，水浴中预温至 72℃后，调整 pH 至 7.0。

2. 将洗脱液 II 倒入干净的染色缸中，室温（20～25℃）放置。

3. 从杂交室中取出组装好的 Multiprobe® 装置。

4. 小心卸下 Multiprobe® 装置，立即将片子放在洗脱液 I 中 2min，用镊子夹住片子，轻轻的上下振荡。

5. 转移到洗脱液 II 中 30s。

6. 夹住片子的长边，在纸上沥去过量液体 10～20s，但注意玻片表面不能干。

7. 加 20μL 含 DAPI 的抗淬灭剂溶液到盖玻片（24mm×60mm，试剂盒中提供）的两端，轻轻地将片子上的杂交区域压到盖玻片上。

8. 检查复染的区域，用钝头镊子轻轻按压排掉气泡。

9. 将吸水纸盖在标本上方，轻轻按压以除去过量的液体。

10. 将指甲油涂在盖玻片周围来封片。

11. 观察前至少在黑盒或玻片夹中放置至少 10min 以备阅片。

3.2.5 荧光显微镜下分析杂交后的片子

1. 将标本放在显微镜载物台上（见注释 13）。

2. 使用 10 倍的物镜和 DAPI 滤光片观察第一方块，观察单个细胞的中期染色体。

3. 加镜油到方形块，转换成 100 倍的油镜。

4. 转换到三通滤光片（DAPI/FITC/德克萨斯红）观察中期染色体。

5. 计数绿色短臂信号和长臂红色端粒信号，并记录染色体的位置。第一方块的正常实验结果是 1 号染色体上有两个绿色信号在短臂端粒区，两个红色信号在长臂端粒区（见注释 14）。

6. 分别用 FITC 滤光片或德克萨斯红滤光片确认实验结果。

7. 重复步骤 2～6，直到该孔中不同的 5 个中期分裂相均得到明确的结果。

8. 每个孔的检测都重复步骤 2～7。

9. 记录分析结果，任何不正常的结果或者某些探针杂交结果不满意时，应该用这些探针重做杂交实验（见注释 15）。

10. 确认异常时采用患者的新鲜样本，可能的话同时分析父母样本，这样将有助于判定异常是否是真异常（如果为真异常的话，确定是原发的还是家族遗传的），还是良性多态变异的结果（见注释 16）。

3.3 端粒克隆 DNA 的抽提（见注释 17）

1. 准备含特定抗生素（50μg/mL 氨苄青霉素、35μg/mL 卡那霉素或 12.5μg/mL 氯霉素）的 LB 平板。

2. 从−70℃取出甘油保存管，放在干冰上（见注释 18）。

3. 取甘油保存的菌种在 LB 平板划线后，37℃细菌培养箱培养过夜。

4. 加 100mL 2×YT 培养基到 500mL 离心管中，按步骤 1 所示浓度加抗生素。

5. 从平板上挑选单克隆接种到 2×YT 培养基，37℃摇床中培养过夜。

6. 取 700μL 细菌培养物加 300μL 100%甘油混合均匀，分装在两个 Eppendorf 管中，标记好，−70℃条件下保存。

7. 剩余的细菌培养物 350*g* 离心 15min。

8. 弃上清，将离心管倒扣在纸上沥干。

9. 用 30mL 冷的细胞重悬液悬起沉淀，剧烈混匀和抽吸几次，使得小细胞团块彻底悬起。

10. 加 30mL 细胞裂解液，上下轻轻颠倒一次。

11. 室温放置 5min（不要延长时间）。

12. 立即加 30mL 冷的中和液，上下轻轻颠倒混匀。

13. 冰上放置 15min，每 5min 上下颠倒几次。

14. 4℃下 4000*g* 离心 40min。

15. 标记好一个新的 250mL 离心管，上面放一个塑料漏斗。

16. 剪一个圆形的杂交网筛，中间剪开一个裂缝，装到漏斗上。

17. 小心将离心的上清倒在网筛上，液体经过网筛和漏斗收集到 250mL 离心管里，注意不要有絮状物穿过网筛。

18. 移去漏斗、网筛，用水、乙醇清洗以备下次使用。

19. 加 0.7 倍体积的无水异丙醇沉淀 DNA。

20. 混合均匀，4000*g* 离心 10min。

21. 弃上清，加入 25mL 70%乙醇。

22. 振荡混匀，4000*g* 离心 10min。

23. 弃上清，将离心管倒扣在纸上以去掉多余液体。

24. 用 1mL TE（pH 8.0）重悬 DNA 沉淀（见注释 19）。

25. 取 5μL 抽提的 DNA 在 0.9%的凝胶上电泳检测，用 λ*Hin*dIII DNA 作为参考标准，完整的黏粒大小应该在大分子质量的位置。

26. 测量抽提的 DNA 浓度（如使用荧光光度计）。

27. 在－20℃储存抽提的 DNA。

3.4 用缺口平移法间接标记端粒克隆 DNA（见注释 20 和 21）

1. 将 Eppendorf 管放在冰上，然后加入 1.0μg 待标记 DNA、1.2μL 生物素-16-dUTP（如果标记短臂探针）或地高辛-11-dUTP（如标记长臂探针）、5.0μL 10× dNTP 混合物、5.0μL 10×缺口平移缓冲液、5.0μL 100mmol/L DTT、4.0μL DNase I（2.5ng/μL）(见注释 22)、1.0μL DNA 聚合酶 I（10 000U/μL）、*x*μL 蒸馏水至总体积 50μL。

2. 轻轻振荡，稍离心以去气泡。

3. 在 15℃水浴中反应 90min。

4. 将反应体系放在冰上暂停反应。

5. 取 5μL 在 2%的琼脂糖凝胶上检测片段大小，用 PhiX174 作为 DNA 大小的参考标准。

6. 最适于杂交的片段大小为 50～500bp 条带。如果片段大于 500bp，则补加 1.0μL DNase I，15℃孵育 30min。

7. 当探针大小合适时，用装有交联葡聚糖 G50 的 SELECT-B 离心柱过柱去掉未结合的核苷酸。

8. 加 25μL 鲑鱼精 DNA（若标记的探针超过 1μg，则按比例增加鲑鱼精 DNA）。

9. 加蒸馏水调整探针浓度为 10ng/μL（应扣除已用于检测的探针量）。

10. 记录 10ng/μL 探针混合物的体积。

11. 每微升探针混合物加入适量的人 Cot-1 DNA［加入量依据探针和原始插入的片段大小而定（见注释 23)］。

12. 计算好含 120ng 探针的人 Cot-1 DNA/探针混合物的体积，按体积取出移到新的 Eppendorf 管中。

13. 在真空离心机中离心干燥 Cot-1 DNA/探针混合物（注意不要过于干燥)。

14. 为了获得某染色体长短臂端粒特异性探针杂交液混合物，将 Cot-1 DNA/长臂或短臂探针混合物分别重悬在 38μL 杂交液中，两者合并成 76μL 杂交液。

15. 若制备单独检测长臂或短臂端粒的探针，则将 Cot-1 DNA/探针混合物直接重悬在 76μL 杂交液中。

16. 混匀后在－20℃条件下储存。

3.5 间接标记探针的杂交和杂交后处理（见注释 20）

3.5.1 杂交

1. 打开加热板，调整温度到 75℃并预热。

2. 取 18μL 探针杂交液到 Eppendorf 管，并预热到 37℃（水浴锅或加热板)。

3. 按照 3.2.1 中所示方法调整细胞悬液至最佳浓度。

4. 将高质量显微载玻片浸泡在无水甲醇中 2min。

5. 用干净的软纸擦干片子。

6. 将 10～20μL 调整好浓度的细胞悬液滴加到载玻片的中央。

7. 将标本放置干燥，用相差显微镜的 10 倍物镜检查标本的质量。

8. 在磨砂处标记实验内容，用钻石笔在载玻片背面划定样品区域。

9. 准备一个染色缸装 2×SSC，三个染色缸依次装 70%、85%和 100%的乙醇。

10. 将制备好的片子（用固定的细胞悬液点样）用 2×SSC 洗 2min，然后依次在 70%、85%和 100%的乙醇中各脱水 2min。

11. 片子空气干燥后，有样品一面朝上放在 37℃加热板上。

12. 轻轻上下抽吸混匀预热的杂交液，小心不要产生气泡。

13. 吸取杂交液加到钻石笔划定区域的中央。

14. 小心地将一个 22mm×22mm 盖玻片盖到杂交液，用钝头镊子轻轻按压排掉气泡。

15. 小心地将片子（盖玻片一面朝上）放在 75℃加热板上。

16. 变性 1～3min，变性时间取决于细胞悬液的老化程度（见注释 12 和 24）。

17. 变性后立即转移到预热的避光塑料玻片盒中，37℃水浴中杂交过夜（水浴锅不盖盖子）。

3.5.2 杂交后洗脱、抗体检测和复染

1. 准备封闭液和抗体溶液 1～3（见注释 25）。

2. 振荡抗体溶液，在微型离心机中以最大转速离心 10min。避光放置，如有必要可在室温中预温。

3. 加洗脱液 I 到干净的染色缸中，水浴中预温到 72℃后调整 pH 至 7.0。

4. 加洗脱液 II 到干净的染色缸中，室温（20～25℃）放置。

5. 同时将用水湿润的吸水纸放在一个空的避光塑料玻片盒（如空的玻片盒）的底部。

6. 用剪刀为每个标本准备 4 张大小约为 22mm×64mm 的封口膜。

7. 从避光塑料盒中取出标本，在纸上快速去掉盖玻片。

8. 立即将片子放在洗脱液 I 中 2min，用镊子夹住片子，轻轻的上下振荡。

9. 转移到洗脱液 II 中 30s。

10. 夹住片子的长边，在纸上沥去过量液体 10～20s，注意不要使片子表面过于干燥。

11. 将片子架到预先准备好的避光塑料玻片盒子中（如玻片两端搭在玻璃棒上或盒子底部平台上），取 300μL 封闭液加到片子上，用封口膜覆盖，避免产生气泡。

12. 盖上玻片盒盖子，37℃温箱中孵育 40～50min。

13. 37℃预热 1.5L ST 缓冲液。

14. 孵育完成后去掉封口膜，将片子放在标本架上浸泡在预热的 ST 缓冲液中。

15. 放在摇床平台上振荡 3min，将倒置的避光容器放在上面保持暗环境。

16. 按步骤 10 所示方法沥去标本上的过量液体。

17. 将片子放到避光塑料玻片盒中架子上，取 80μL 抗体溶液 1 加到杂交区域。

18. 用封口膜覆盖，避免产生气泡。

19. 盖上盖子，37℃温箱中孵育 10min。

20. 去掉封口膜，将片子放在标本架上浸泡在预热的 ST 缓冲液。

21. 放在摇床平台上避光振荡 3min。

22. 倒掉原来的 ST 缓冲液，更换新的预热 ST 缓冲液。

23. 重复 2 次步骤 21 和 22。

24. 洗完 3 次后，按步骤 10 所示方法沥去过量液体。

25. 将片子放到塑料避光容器中架子上，取 80μL 抗体溶液 2 加到杂交区域。

26. 用封口膜覆盖，避免产生气泡。

27. 盖上盖子，37℃温箱中孵育 10min。

28. 去掉封口膜，在热的新 ST 缓冲液中洗 3 次，每次 3min。

29. 将片子按步骤 10 所示沥去过量液体。

30. 将片子放到塑料避光容器中架子上，取 80μL 抗体溶液 3 加到杂交区域。

31. 盖上盖子，37℃温箱中孵育 10min。

32. 去掉封口膜，在热的新 ST 缓冲液洗 3 次，每次 3min。

33. 在最后 ST 缓冲液洗脱过程中，加大约 25μL DAPI 复染液到放在纸上的 22mm×22mm 盖玻片上。

34. 将片子按步骤 10 所示沥去过量液体。

35. 轻轻地将片子的杂交区域倒扣到加有 DAPI 复染液的盖玻片上。

36. 将吸水纸盖在标本上方，轻轻按压以除去过量的复染液。

37. 检查复染的区域，用钝头镊子轻轻按压排掉气泡。

38. 将指甲油涂在盖玻片周围来封片。

39. 按 3.2.5 中所示方法避光放置至干燥后用荧光显微镜观察。

4. 注释

1. 要制备高质量的染色体标本，最好使用肝素锂抗凝管收集外周血样品，样品应该室温运输并尽块进行培养。固定的细胞悬液质量随着储存时间的增加会明显下降。

2. 封闭液可以大量制备，过滤后分装，可在 4℃储存至 6 个月。

3. 1mL 抗体溶液 4℃避光可储存 1 个月。

4. 为避免污染，细胞培养基应使用细胞培养专用的水浴锅。

5. 秋水仙胺阻止纺锤体形成，使细胞染色体阻滞在细胞分裂中期。秋水仙胺处理细胞的时间影响染色体的形态。如果处理时间太短，染色体可能会比较长，造成分裂指数较低；如果处理时间过长，染色体会太短而不适于分析。

6. 低渗处理时间不够时，染色体无法从细胞中释放。处理时间过长，会造

成大量细胞提前破裂。

7. 尽管 Chromoprobe Multiprobe®-T 试剂盒提供的探针和试剂已经由 Cytocell 公司质检过，还是建议先使用高质量的正常对照染色体悬液进行预实验优化试剂盒杂交条件，然后再进行非常重要的待测样品的杂交。

8. 尽管理想的分裂指数应≥5%，但是有时会存在一些问题无法达到这个指标，例如，样品的制备时间长短或者来源（如白血病样品的有丝分裂就常常不够）。在这种情况下，应该确保在标本中央区约有 5 个中期分裂相。当有些样品的分裂指数非常低且样品又少的情况下，应该选择使用多色 FISH 技术，如 M-TEL 来分析样品[71]。

9. 如果仅仅是少数方形块上的中期染色体不够，可以在原来上样的位置再点样。

10. 可以将标本加热块翻转使得最上面是平面作为 37℃加热板。但 75℃电热恒温板必须是实心的，表面温度均匀。

11. 最好是用一只手的食指和拇指拿住磨砂位置举起片子/Multiprobe 装置，然后用另一只手的食指和拇指拿住（勿挤压装置）片子/Multiprobe 装置，并翻转，可以用手掌或者用托盘托住保持水平进行转移。

12. 正确的变性是很重要的。如果染色体变性时间太长，染色体会发胀并有可能沿着染色体臂留下探针信号（图 2C）。相反，变性时间不够，虽然能保持染色体形态，但是如果能杂交上则杂交效率很低。总之，−20℃储存越久的细胞悬液，染色体变性时间应越长。例如，标本制备与杂交在同一天，那么变性的时间仅需要 45s，然而一个样品放置超过一年，变性时间大于 3min。制备时间为 1～3 月的样品 75℃平均变性时间是 1min、15s。

13. 一些显微镜的载物台使观察片子末端比较困难，如果遇到这种情况，可以采用 180°旋转片子的方式使末端容易观测。

14. 在记录结果以前，应该先熟悉使用的端粒克隆特点以避免发生错误的解释。某些克隆用于多态性检测是很正常的，这些克隆只和对应的同源端粒杂交，但是如果存在多态性，这些克隆仅有部分杂交上或者根本就没和同源的染色体杂交上。另外，有些克隆有交叉杂交的特点，这些克隆除了与同源的端粒杂交外，还和其他端粒杂交[24]。举例说明，如图 2 中显示正常的 3p3q 杂交模式、2q 探针多态性、12p 的交叉杂交以及的一种具临床意义的不平衡端粒重排。表 2 列出了已知的第一代和第二代端粒克隆的多态性和交叉杂交模式。

15. 当必须重复实验时，应该确定使用整个新的 Multiprobe® 玻片和装置是否合理。其他可选择的方式包括：①重新购买已经标记好的单个端粒探针（Cytocell 公司或 Appligene Oncor 或 Vysis）；②获得一套甘油保存的端粒克隆，自己制备 DNA 和杂交用探针。后一种方式是比较经济的，一旦扩增克隆就可以批量标记和储存探针，合适的探针可以在−20℃至少储存 2 年。表 1 列出第一代和

第二代端粒克隆有哪些，这些克隆的甘油保存株或穿刺培养物可以从何处获得；同时标记出 Chromoprobe Multiprobe®-T 试剂盒使用的端粒克隆。

16. 一些与众不同的的结果可能反映真的亚端粒重排或者端粒多态性，但是此时更应该避免错误解释的发生。表 2 列举了使用第一代和第二代端粒特异性克隆探针有关的多态性和交叉杂交模式。图 2 是 FISH 实验实例。

表 2　第一代端粒克隆，第二代端粒克隆的交叉杂交和多态性[a]

	第一代克隆		第二代克隆	
	端粒	克隆	端粒	克隆
多态性	2q	210-E14	2q	GS-1011-O17
	XpYp	CY29	9p	GS-43-N6
交叉杂交	5p 与端着丝粒染色体	84c1	8p 与 1p、3q（信号弱）	GS-580-L5
	5q 与端着丝粒染色体	GS-90-I5	9q 与 10p、16p、18p、XqYq（信号弱）	GS-112-N13
	8p 与 1p	2205a2	11p 与 17p	GS-908-H22
	11p 与 17p	2209a2	11q 与 12q 中间片段	GS-770-G7
	12p 与 6p、20q（信号弱）	GS-90-I5	12p 与 6p、20q（信号弱）	GS-496-A11
			12p 与 6p、20q（信号弱）	GS-8-M16
			15q 与 1q 中间、15q 中间片段	GS-124-O5
			17p 与两个 17q 中间片段	GS-202-L17
			17q 与 1p、6q（信号弱）	GS-362-K4
			20q 与 6p（信号弱）	GS-81-F12
			22q 与 2q 中间片段	GS-99-K24

a　从文献 Kight S. J. L，Flint J. J. Med. Genet. 2000，37，401～409 中稍做修改。得到了 BMJ 出版集团的同意。

17. 如果使用 Cytocell 公司 Chromoprobe Multiprobe®-T 试剂盒或其他市售试剂盒（如 Vysis 公司的 Totel Vysion Multicolor FISH Probe Panel 试剂盒）就没必要制备端粒克隆 DNA。但是可以获得和保存一套端粒克隆，以备少量重复实验所需。表 1 列出第一代和第二代端粒克隆有哪些，这些克隆的甘油保存株或穿刺培养物可以从何处获得，表 1 中的清单也包括 Chromoprobe Multiprobe®-T 试剂盒使用的端粒克隆。

18. 如果没有干冰，甘油保存株可以放在冰上较短的时间，但是反复这样操作会降低甘油保存株的活性。

19. 如果沉淀没能很快悬起，可以在 4℃条件下放置过夜。

20. 如果使用 Cytocell 公司 Chromoprobe Multiprobe®-T 系列试剂盒（Cytocell Ltd.，Adderbury，UK）或其他市售试剂盒，不需进行此部分的操作。

21. 因为间接标记的探针可以保存 2 年左右，所以可以增加标记的 DNA 量和标记反应体积。

22. 批号不同的 DNA 酶可能其实际浓度也有差异，不同的模板使用的 DNase 用量也不同。最好在使用每一批新 DNA 酶时，对模板所用的酶量和反应时间进行优化，以备将来应用相同的条件标记同种模板探针。

23. 每一批次探针的制备都应该优化 Cot-1 的使用量。Cot-1 的用量应根据探针中 Alu 序列的含量。对端粒克隆而言，插入片段为 30～40kb 的标记黏粒，Cot-1 的用量一般是 625ng/μL 探针混合物；插入片段为小于 100kb 左右的 PAC 和小的 BAC 探针，Cot-1 的用量一般是 1μg/μL 探针混合物；大的 BAC 探针，可加到 3μg/μL 探针混合物。注意例外的是 19 号染色体的探针克隆，如 F20643 和 20283 需要加入 10μg Cot-1/μL 探针混合物。

24. 如果没有电热恒温板，染色体可以在 10%甲酰胺/0.1mmol/L EDTA/2×SSC 中 70℃变性 5min 后，在 4℃下用 2×SSC 洗 3 次，然后用系列乙醇脱水。探针混合物在加入到标本上之前进行单独变性，95℃、5min。

25. 应该根据单色或双色检测的需要正确配制抗体溶液，抗体浓度是非常重要的。如果抗体的浓度太低，就可能没有杂交信号或杂交效率很低。相反，浓度太高，可能会出现斑点样的背景，无法分辨是同源信号还是背景(图2D)。由于不同批次的抗体可能存在差异，所以在测试正式样品前，最好是先用可靠的对照探针与高质量的染色体悬液进行杂交，优化抗体稀释的浓度。

（黄　英 译，刘青杰 校）

参考文献

1. Saccone, S., De Sario, A., Della Valle, G., and Bernardi, G. (1992) The highest gene concentrations in the human genome are in telomeric bands of metaphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89,** 4913–4917.
2. Altherr, M. R., Bengtsson, U., Elder, F. F. B., et al. (1991) Molecular Confirmation Of Wolf-Hirschhorn Syndrome With a Subtle Translocation Of Chromosome-4. *Am. J. Hum. Genet.* **49,** 1235–1242.
3. Kuwano, A., Ledbetter, S. A., Dobyns, W. B., Emanuel, B. S., and Ledbetter, D. H. (1991) Detection of deletions and cryptic translocations in Miller-Dieker syndrome by *in situ* hybridization. *Am. J. Hum. Genet.* **49,** 707–714.
4. Lamb, J., Harris, P. C., Wilkie, A. O. M., Wood, W. G., Dauwerse, J. G., and Higgs, D. R. (1993) De novo truncation of chromosome 16p and healing with $(TTAGGG)_n$ in the α-thalassemia/mental retardation syndrome (ATR-16). *Am. J. Hum. Genet.* **52,** 668–676.
5. Overhauser, J., Bengtsson, U., McMahon, J., et al. (1989) Prenatal diagnosis and carrier detection of a cryptic translocation by using DNA markers from the short arm of chromosome 5. *Am. J. Hum. Genet.* **45,** 296–303.
6. Wilkie, A. O. M., Lamb, J., Harris, P. C., Finney, R. D., and Higgs, D. R. (1990) A truncated chromosome 16 associated with α-thalassaemia is stablised by the addition of telomeric repeats $(TTAGGG)_n$. *Nature.* **346,** 868–871.

7. Wong, A. C. C, Ning, Y., Flint, J., et al. (1997) Molecular characterization of a 130–kb terminal microdeletion in a child with mild mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* **60,** 113–120.
8. Brown, W. R. A., MacKinnon, P. J., Villasanté, A., Spurr, N., Buckle, V. J., and Dodson, M. J. (1990) Structure and polymorphism of human telomere-associated DNA. *Cell* **63,** 119–132.
9. Royle, N. J., Baird, D. M., and Jeffreys, A. J. (1994) A subterminal satellite located adjacent to telomeres in chimpanzees is absent from the human genome. *Nat. Genet.* **6,** 52–56.
10. Weber, B., Collins, C., Robbins, C., et al. (1990) Characterization and organization of DNA sequences adjacent to the human telomere associated repeat $(TTAGGG)_n$. *Nucl. Acids Res.* **18,** 3353–3361.
11. Wilkie, A. O. M., Higgs, D. R., Rack, K. A., et al. (1991) Stable length polymorphism of up to 260 kb at the tip of the short arm of human chromosome 16. *Cell* **64,** 595–606.
12. Cross, S., Lindsey, J., Fantes, J., McKay, S., McGill, N., and Cooke, H. (1990) The structure of a subterminal repeated sequence present on many human chromosomes. *Nucl. Acids Res.* **18,** 6649–6657.
13. Rouyer, F., de la Chapelle, A., Andersson, M., and Weissenbach, J. (1990) A interspersed repeated sequence specific for human subtelomeric regions. *EMBO J.* **9,** 505–514.
14. Knight, S. J. L., Horsley, S. W., Regan, R., et al. (1997) Development and clinical application of an innovative fluorescence in situ hybridization technique which detects submicroscopic rearrangements involving telomeres. *Eur. J. Hum. Genet.* **5,** 1–8.
15. National Institutes of Health, Institute of Molecular Medicine Collaboration (1996) A complete set of human telomeric probes and their clinical application. *Nat. Genet.* **14,** 86–89.
16. Giraudeau, F., Aubert, D., Young, I., et al. (1997) Molecular-cytogenetic detection of a deletion of 1p36.3. *J. Med. Genet.* **34,** 314–317.
17. Youngman, S., Bates, G., Williams, S., et al. (1992). The telomeric 60 kb of chromosome arm 4p is homologous to telomeric regions on 13p, 15p, 21p and 22p. *Genomics* **14,** 350–356.
18. Wright, T. J., Wijmenga, C., Clark, L. N., Frants, R. R., Williamson, R., and Hewitt, J. E. Fine mapping of the FSHD gene region orientates the rearranged fragment detected by the probe p13E-11. *Hum. Mol. Genet.* **2,** 1673–1678.
19. Riethman, H. C., Spais, C., Buckingham, J., Grady, D., and Moyzis, R. K. (1993) Physical analysis of the terminal 240 kb of DNA from human chromosome 7q. *Genomics* **17,** 25–32.
20. Ning, Y., Rosenberg, M., Biesecker, L. G., and Ledbetter, D. H. (1996) Isolation of the human chromosome 22q telomere and its application to detection of cryptic chromosomal abnormalities. *Hum. Genet.* **97,** 765–769.
21. Nesslinger, N. J., Gorski, J. L., Kurczynski, T. W., et al. (1994) Clinical, cytogenetic, and molecular characterization of seven patients with deletions of chromosome 22q13.3. *Am. J. Hum. Genet.* **54,** 464–472.
22. Cooke, H. J., Brown, W. R., and Rappold, G. A. (1985) Hypervariable telomeric sequences from the human sex chromosomes are pseudoautosomal. *Nature* **317,** 687–692.
23. Kvaloy, K., Galvagni, F., and Brown, W. R. (1994) The sequence organization of the long arm pseudoautosomal region of the human sex chromosomes. *Hum. Mol. Genet.* **3,** 771–778.
24. Knight, S. J., Lese, C. M., Precht, K. S., et al. (2000) An optimized set of human telomere clones for studying telomere integrity and architecture. *Am. J. Hum. Genet.* **67,** 320–332.

25. Knight, S. J., Regan, R., Nicod, A., et al. (1999) Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet* **354,** 1676–1681.
26. Brackley, K. J., Kilby, M. D., Morton, J., Whittle, M. J., Knight, S. J., and Flint, J. (1999) A case of recurrent congenital fetal anomalies associated with a familial subtelomeric translocation. *Prenat. Diagn.* **19,** 570–574.
27. de Vries, B. B., Bitner-Glindzicz, M., Knight, S. J., et al. (2000) A boy with a submicroscopic 22qter deletion, general overgrowth and features suggestive of FG syndrome. *Clin. Genet.* **58,** 483–487.
28. Warburton, P., Mohammed S., and Ogilvie, C. M. (2000) Detection of submicroscopic subtelomeric chromosome translocations: a new case study. *Am. J. Med. Genet.* **6,** 51–55.
29. Bacino, C. A., Kashork, C. D., Davino, N. A., and Shaffer, L. G. (2000) Detection of a cryptic translocation in a family with mental retardation using FISH and telomere region-specific probes. *Am. J. Med. Genet.* **92,** 250–255.
30. Praphanphoj, V., Goodman, B. K., Thomas, G. H., and Raymond, G. V. (2000) Cryptic subtelomeric translocations in the 22q13 deletion syndrome. *J. Med. Genet.* **37,** 58–61.
31. Knight-Jones, E., Knight, S., Heussler, H., Regan, R., Flint, J., and Martin, K. (2000) Neurodevelopmental profile of a new dysmorphic syndrome associated with submicroscopic partial deletion of 1p36.3. *Dev. Med. Child Neurol.* **4,** 2201–2206.
32. Kleefstra, T., van de Zande, G., Merkx, G., Mieloo, H., Hoovers, J. M., and Smeets, D. (2000) Identification of an unbalanced cryptic translocation between the chromosomes 8 and 13 in two sisters with mild mental retardation accompanied by mild dysmorphic features. *Eur. J. Hum. Genet.* **8,** 637–640.
33. Vogels, A., Devriendt, K., Vermeesch, J. R., et al. (2000) Cryptic translocation t(5;18) in familial mental retardation. *Ann. Genet.* **43,** 117–123.
34. de Vries, B. B. A., Knight, S. J. L., Homfray, T., Smithson, S. F., Flint, J., and Winter, R. M. (2001) Submicroscopic subtelomeric 1qter deletions: a recognisable phenotype? *J Med Genet.* **38,** 175–178.
35. Viot, G., Gosset, P., Fert, S., et al. (1999) Cryptic subtelomeric rearrangements detected by FISH in mentally retarded and dysmorphic patients. *Am. J. Hum. Genet.* **63,** Supplement: A10.
36. Slavotinek, A., Rosenberg, M., Knight, S., et al. (1999) Screening for submicroscopic chromosome rearrangements in children with idiopathic mental retardation using microsatellite markers for the chromosome telomeres. *J. Med. Genet.* **36,** 405–411.
37. Rossi, E., Piccini, F., Zollino, M., et al. (2001) Cryptic telomeric rearrangements in subjects with chromosomal phenotype and mental retardation. *J. Med. Genet.* **38,** 417–420.
38. Anderlid, B., Annerén, G., Blennow, E., and Nordenskjöld, M. (1998) Subtelomeric rearrangements detected by FISH in patients with idiopathic mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* **65,** Suppl: A67.
39. Riegel, M., Baumer, A., Jamar, M., et al. (2001) Submicropic terminal deletions and duplications in retarded patient with unclassified malformation syndromes. *Hum. Genet.* **109,** 286–294.
40. Colleaux, L., Rio, M., Heuertz, S., et al. (2001) A Novel automated strategy for screening cryptic telomeric rearrangements in children with idiopathic mental retardation. *Eur. J. Hum. Genet.* **9,** 319–327.
41. Fan, Y. S., Zhang, Y., Speevak, M., Farrell, S., Jung, H. J., and Siu, V. M. (2001) Detection of submicroscopic aberrations in patients with unexplained mental retardation by fluorescence *in situ* hybridization using multiple subtelomeric probes. *Genet. Med.* **3,** 416–421.
42. Clarkson, B., Pavenski, K., Dupuis, L., et al. (2002) Detecting rearrangements in children using subtelomeric FISH and SKY. *Am. J. Med. Genet.* **107,** 267–274.

43. Baker, E., Hinton, L., Callen, D. F., et al. (2002) Study of 250 childrren with idiopathic mental retardation reveals nine cryptic and diverse subtelomeric chromosome anomalies. *Am. J. Med. Genet.* **107,** 285–293.
44. Lamb, A. N., Lytle, C. H., Aylsworth, A. S., et al. (1998) Low proportion of subtelomeric rearrangements in a population of patients with mental retardation and dysmorphic features. *Am. J. Hum. Genet.* **65,** Suppl: A169.
45. Vorsanova, S. G., Koloti, D., Sharonin, V. O., Soloviev, V., and Yurov, Y. B. (1998) FISH analysis of microaberrations at telomeric and subtelomeric regions in chromosomes of children with mental retardation. *Am. J. Hum. Genet.* **65,** Suppl: A154.
46. Joyce, C. A., Hart, H. H., Fisher, A. M., and Browne, C. E. (1999) Use of subtelomeric FISH probes to detect abnormalities in patients with idiopathic mental retardation and characterize rearrangements at the limit of cytogenetic resolution. *J. Med. Genet.* **36,** Suppl: S16.
47. Ballif, B. C., Kashork, C. D., and Shaffer, L. G. (2000) The promise and pitfalls of telomere region-specific probes. *Am. J. Hum. Genet.* **67,** 1356–1359.
48. Anderlid B-M, Schoumans, J., Annerén, G., et al. (2002) Subtelomeric rearrangements detected in patients with idiopathic mental retardation. *Am. J. Med. Genet.* **107,** 275–284.
49. de Vries, B. B., White, S. M., Knight, S. J., et al. (2001) Clinical studies on submicroscopic subtelomeric rearrangements: a checklist. *J. Med. Genet.* **38,** 145–150.
50. Knight, S. J. and Flint, J. (2000) Perfect endings: a review of subtelomeric probes and their use in clinical diagnosis. *J. Med. Genet.* **37,** 401–409.
51. Joyce, C. A., Dennis, N. R., Cooper, S., and Browne, C. E. (2001) Subtelomeric rearrangements: results from a study of selected and unselected probands with idiopathic mental retardation and control individuals by using high-resolution G-binding and FISH. *Hum. Genet.* **109,** 440–451.
52. Horsley, S. W., Knight, S. J. L., Nixon, J., et al. (1998) Del(18p) shown to be a cryptic translocation using a multiprobe FISH assay for subtelomeric chromosome rearrangements. *J. Med. Genet.* **35,** 722–726.
53. Brkanac, Z., Cody, J. D., Leach, R. J., and DuPont, B. R. (1998) Identification of cryptic rearrangements in patients with 18q-deletion syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **62,** 1500–1506.
54. Benzacken, B., Monier-Gavelle, F., Pierre Siffroi, J., Agbo, P., Chalvon, A., and Philippe Wolf, J. (2001) Acrocentric chromosome polymorphisms: beware of cryptic translocations. *Prenat. Diagn.* **21,** 96–98.
55. Tosi, S., Scherer, S. W., Giudici, G., Czepulkowski, B., Biondi, A., and Kearney, L. (1999) Delineation of multiple deleted regions in 7q in myeloid disorders. *Gene. Chromosom. Canc.* **25,** 384–392.
56. Tosi, S., Giudici, G., Rambaldi, A., et al. (1999) Characterization of the human myeloid leukemia-derived cell line GF-D8 by multiplex fluorescence in situ hybridization, subtelomeric probes, and comparative genomic hybridization. *Gene. Chromosom. Canc.* **24,** 213–221.
57. Jaju, R. J., Haas, O. A., Neat, M., et al. (1999) A new recurrent translocation, t(5;11)(q35;p15.5), associated with del(5q) in childhood acute myeloid leukemia. *Blood* **94,** 773–780.
58. Foot, N., Neat, M. J., Kearney L et al. (1999) Multiple FISH technology to clarify abnormal leukaemic karyotypes. *J. Med. Genet.* **36,** S38.
59. Wakui, K., Tanemura, M., Suzumori, K., Hidaka, E., Ishikawa, M., Kubota, T., et al. (1999) Clinical applications of two-color telomeric fluorescence in situ hybridization for prenatal diagnosis: identification of chromosomal translocation in five families with recurrent miscarriages or a child with multiple congenital anomalies. *J. Hum. Genet.* **44,** 85–90.

60. Scriven, P. N., Handyside, A. H., and Ogilvie, C. M. (1998) Chromosome translocations: segregation modes and strategies for preimplantation genetic diagnosis. *Prenat. Diagn.* **18,** 1437–1449.
61. Handyside, A. H., Scriven, P. N., and Ogilvie, C. M. (1998) The future of preimplantation genetic diagnosis. *Hum. Reprod.* **13 Suppl 4,** 249–255.
62. Mackie-Ogilvie, C., Harrison, R. H., Handyside, A. H., and Scriven, P. N. (1999) The use of subtelomeric probes in preimplantation genetic diagnosis. *J. Med. Genet.* **36,** Supplement: S15.
63. Lese, C. M., Zhang, X., Pinkel, D., et al. (1999) Comparative genomic hybridization arrays: Towards a "telomere chip." *Am. J. Hum. Genet.* **65,** 41.
64. Ghaffari, S. R., Boyd, E., Tolmie, J. L., Crow, Y. J., Trainer, A. H., and Connor, J. M. (1998) A new strategy for cryptic telomeric translocation screening in patients with idiopathic mental retardation. *J. Med. Genet.* **35,** 225–233.
65. Rosenberg, M. J., Vaske, D., Killoran, C. E., et al. (2000) Detection of chromosomal aberrations by a whole-genome microsatellite screen. *Am. J. Hum. Genet.* **66,** 419–427.
66. Borgione, E., Giudice, M. L., Galesi, O., et al. (2001) How microsatellite analysis can be exploited for subtelomeric chromosomal rearrangement analysis in mental retardation. *J. Med. Genet.* **38,** E1.
67. Rosenberg, M. J., Killoran, C. Dziadzio, L., et al. (2001) Scanning for telomeric deletions and duplications and uniparental disomy using genetic markers in 120 children with malformations. *Hum. Genet.* **109,** 311–318.
68. Armour, J. A., Sismani, C., Patsalis, P. C., and Cross, G. (2000) Measurement of locus copy number by hybridisation with amplifiable probes. *Nucl. Acids Res.* **28,** 605–609.
69. Sismani, C., Armour, J. A., Flint, J., Girgallia, C., Regan, R., and Patsalis, P. C. (2001) Screening for subtelomeric chromosome abnormalities in children with idiopathic mental retardation using the multiprobe telomere FISH and the new MAPH telomeric assays. *Eur. J. Hum. Genet.* **9,** 527–532.
70. Granzow, M., Popp, S., Keller, M., et al. (2000) Multiplex FISH telomere integrity assay identifies an unbalanced cryptic translocation der(5)t(3;5)(q27;p15.3) in a family with three mentally retarded individuals. *Hum. Genet.* **107,** 51–57.
71. Brown, J., Saracoglu, K., Uhrig, S., Speicher, M. R., Eils, R., and Kearney, L. (2001) Subtelomeric chromosome rearrangements are detected using an innovative 12-color FISH assay (M-TEL). *Nat. Med.* **7,** 497–501.
72. Brown, J., Horsley, S. W., Jung, C., et al. (2000) Identification of a subtle t(16;19)(p13.3;p13.3) in an infant with multiple congenital abnormalities using a 12–colour multiplex FISH telomere assay, M-TEL. *Eur. J. Hum. Genet.* **8,** 903–910.

第 13 章　荧光基因分型筛查微小亚端粒重排

Laurence Colleaux，Solange Heuertz，
Florence Molinari，Marlene Rio

1. 引言

定义为智商（IQ）低于 70 的智力障碍，是儿童和年轻人中最常见的严重残疾。人群中约 1%患中度到重度的智力障碍（IQ<50），如果加上轻度的智力障碍（50<IQ<70）则患病率可上升到 2%～3%[1,2]。多种因素可以导致智力障碍，包括环境因素（如胎儿乙醇综合征或围产期的缺血缺氧性损伤）、染色体的原因（如 21 三体）或单基因病（如脆性 X 综合征）。染色体的异常（如导致正常的基因数量改变，如缺失、重复或单亲二倍体）是导致智力障碍的常见原因，约占随机发生的智力障碍病例的 12%[3]。涉及的染色体片段通常都很小（<10Mb),但是包括单独影响表型的多个基因。常规的染色体分析可以检测 10Mb 左右染色体片段的重复或缺失，仍高于引起表型改变的阈值。尽管采用多种途径试图提高可靠性和分辨率，但仍没有实用的方法筛查全基因组的、不论片段大小或染色体位置的重排。

1.1　自发性智力障碍儿童的端粒重排

将近 40%的中度到重度的智力障碍病例是由未知的遗传因素造成的，因此称之为自发性智力障碍[4,5]。近年来，在特定的智力障碍综合征的患者中染色体核型分析显示正常，但已经证明亚显微染色体末端重排的存在。染色体 4p16.3、5p15.2、17p13.3 缺失病例的情况就是如此（见注释 1）。然而在大多患者中，其他端粒区域的缺失很少有特征性的表型，这就很难通过特异的临床表型确定这些综合征。利用高度变异的 DNA 多态性来分析端粒异常的策略，对一些不明原因的智力障碍患者进行试验性研究表明：6%的自发性智力障碍可以用涉及端粒的亚显微重排来解释[6]。

1.2 微小端粒重排的分子检测策略

几种检测染色体末端畸变的方法已经建立，其中有一种新的荧光原位杂交技术（FISH）[7]。使用独特的一套染色体端粒特异性探针的 FISH 方法，可以直接确定端粒序列的增加或丢失；Knight 和他的同事进行的一次较大规模研究结果显示：自发性智力障碍的儿童中有 7.4%发生微小的染色体端粒异常，表明 FISH 技术是强有力的诊断工具[8]。但是，这项技术的费用较贵，很难用于常规的检测。另外，该方法不能检测易于发生亚显微重排的其他基因组重要区域[9,10]。因此，提出了一项被称为比较基因组杂交（CGH）的全基因组扫描技术[10~12]。然而，这项技术不能检测小于 5Mb 的微小异常，并且还需要特殊的显微镜和电脑设备。建立一种有效而可靠的检测小片段端粒重排的新方法成为公共卫生领域的主要挑战。

微卫星标志物是自然发生多态性变化的 DNA 片段，可以用来寻找不正常的等位基因遗传，并且可以检测缺失、重复、单亲二倍体等[13]。以常规基因分型方法为基础的探索性研究确定 27 个自发性智力障碍的儿童中有端粒区域的两种缺失[14]。最近，我们在端粒特异性微卫星的自动化荧光基因分型的基础上提出检测端粒异常的新策略[15]。这些位点扩增的相应 PCR 产物在自动化测序仪上进行分析，用特殊的软件确定等位基因结构图。对于每一个标记物，确定受累儿童的基因型，然后同他们父母的基因型进行比较，发现任何非孟德尔分离的病例。

为了评估该方法的可行性和灵敏度，我们在一些特定的临床患者中进行了实验性研究。分析了来自 77 个独立家庭的 92 个智力障碍儿童，这些患者的父母非近亲且具有正常的高分辨率核型。但这些儿童都患有严重的自发性智力障碍、异常面容并伴有下列标准的至少一项：①癫痫；②生长过度或发育停滞；③行为异常；④先天性异常。结果共识别出 11 种的端粒重排：8 种缺失、1 种重复和 2 种单亲二倍体，检出率高达 12%。

我们的研究结果强有力地支持微小端粒重排在自发性智力障碍中发挥着非常重要作用的观点（我们实验中约有 12%），并证明荧光基因分型是检测微小端粒重排非常灵敏的方法。此外，相对于需要较多技术经验、结果变动性大的细胞遗传学分析而言，多方面自动化的基因分型在定量和结果客观方面具有优势；基因分型的优点还包括可以直接识别重排染色体的双亲来源。最后，微卫星 DNA 技术在发现与若干人类疾病机制相关的单亲二倍体方面有独特的优势。

这里列举的标记物其杂合性分数平均为 0.75，因为几乎没有染色体图谱包括端粒区域，几个检测位点可能距离端粒有几百个 kb（表 1）。源自人类基因组测序计划的序列资料，将有望使我们阐述更多的信息和（或）端粒微卫星标记物，所以这里列举的最初一套染色体标记物将会改进，新荧光基团的发现将使我

们减少整套标记物的数量。我们估计一个儿童与其双亲进行一次大范围的基因分型需要花费 80 美金，即比细胞遗传学方法少花费 3～4 倍。自动化程度的提高将使此方法更加经济。

表 1　用于端粒基因分型的微卫星标记物

端粒	D 编号	到端粒的遗传学距离/cM	标记的荧光素	片段大小范围/bp	杂合性
1p	D1S243	0	FAM	142～170	0.86
«	D1S468	6.2	HEX	173～191	0.75
1q	D1S2682	0	NED	110～150	0.76
«	D1S2836	2.6	FAM	268～281	0.79
2p	D2S2268	0	HEX	205～231	0.61
«	D2S323	3.6	FAM	177～193	0.57
2q	D2S2338	0	FAM	155～173	0.55
«	D2S140	4.5	NED	151～167	0.76
3p	D3S1270	0	NED	154～196	0.75
«	D3S1307	1.4	FAM	237～251	0.80
3q	D3S3550	0	FAM	230～270	0.74
«	D3S3707	2.2	HEX	262～278	0.65
4p	D4S3038	0	NED	195～240	0.78
«	D4S2936	0	NED	170～184	0.83
4q	D4S2930	0	NED	216～236	0.80
«	D4S426	1.1	HEX	177～191	0.56
5p	D5S678	0	FAM	252～264	0.71
«	D5S392	0.6	HEX	83～117	0.87
5q	D5S2006	0	HEX	135～165	0.74
«	D5S408	1.8	FAM	247～265	0.73
6q	D6S1600	0	FAM	165～210	0.77
«	D6S344	1.4	HEX	139～159	0.72
6q	D6S281	0	HEX	125～180	0.68
«	D6S1693	10.8	FAM	85～93	0.51
7p	D7S2477	0	FAM	132～180	0.66
«	D7S2563	1.7	HEX	91～111	0.78
7q	D7S2423	0	NED	230～270	0.71
«	D7S2465	1.9	HEX	158～181	0.83
8p	D8S504	0	FAM	193～203	0.71
«	D8S264	0.7	FAM	121～145	0.83

续表

端粒	D编号	到端粒的遗传学距离/cM	标记的荧光素	片段大小范围/bp	杂合性
8q	D8S1836	0	HEX	121～160	0.84
«	D8S1751	1.4	NED	149～163	0.69
9p	D9S1779	0	NED	114～154	0.63
«	D9S1858	0.1	HEX	124～144	0.58
9q	D9S1838	0	NED	155～175	0.83
«	D9S158	3.5	FAM	213～233	0.71
10p	D10S249	0	NED	106～152	0.74
«	D10S558	1.9	NED	192～212	0.80
10q	D10S1700	0	HEX	107～148	0.64
«	D10S212	1	HEX	189～201	0.70
11p	D11S1363	0	FAM	240～260	0.59
«	D11S4177	3.1	FAM	183～213	0.80
11q	D11S968	3.3	HEX	131～165	0.81
«	D11S4125	3.3	FAM	231～253	0.81
12p	D12S352	0	HEX	145～170	0.72
«	D12S341	0.6	FAM	114～130	0.79
12q	D12S357	0	HEX	260～315	0.84
«	D12S1638	0	NED	120～130	0.68
13q	D13S293	0	NED	80～106	0.50
«	D13S1295	4.6	HEX	102～120	0.74
14q	D14S1007	0	HEX	110～135	0.77
«	D14S293	3.9	HEX	153～165	0.65
15q	D15S966	0	HEX	225～265	0.82
«	D15S203	0.6	FAM	116～140	0.62
16p	D16S521	0	FAM	156～172	0.71
«	D16S3024	5	HEX	208～248	0.86
16q	D16S3121	0	HEX	65～90	0.62
«	D16S3407	0	FAM	195～205	0.77
17p	D17S1866	0	HEX	144～195	0.80
«	D17S926	0.6	FAM	243～260	0.80
17q	D17S928	0	NED	76～96	0.75
«	D17S1830	11	HEX	108～122	0.79
18p	D18S59	0.1	HEX	127～182	0.81
«	D18S476	1.6	HEX	263～275	0.76
18q	D18S70	0	FAM	115～135	0.83

续表

端粒	D 编号	到端粒的遗传学距离/cM	标记的荧光素	片段大小范围/bp	杂合性
«	D18S1141	1.9	NED	263～293	0.77
19p	D19S886	0	NED	105～165	0.63
«	D19S883	5.5	HEX	158～170	0.72
«	D19S878	6.5	FAM	208～230	0.83
19q	D19S890	0	HEX	190～210	0.68
«	D19S218	2.5	FAM	240～256	0.60
20p	D20S864	0	FAM	215～235	0.52
«	D20S103	0	FAM	92～106	0.70
20q	D20S173	0	HEX	135～195	0.66
«	D20S171	2.1	FAM	123～149	0.73
21p	D21S1991	0.1	HEX	105～145	0.69
«	D21S1904	0	HEX	152～170	0.52
21q	D21S1879	0	FAM	178～224	0.74
«	D21S1903	0.7	FAM	243～265	0.83
22q	D22S1169	0	FAM	110～135	0.78
«	D22S1161	2.2	HEX	235～245	0.68
Xp	DXYS233	0	HEX	260～300	0.81
«	DXYS234	2	NED	234～254	0.72
Xq	DXS8087	0	FAM	270～300	0.69
«	DXS1073	1.6	HEX	217～243	0.80

然而，要注意这种方法也存在其局限性。首先，它不能检测无数量改变的平衡性重排。其次，数量的差异不能可靠地检出。因此，当患者的双亲拥有相同等位基因或有小的串联重复时，这项技术可能忽略单体或三体。最后，由于微卫星的不稳定性可能产生假阳性结果。因此单个微卫星自身的非孟德尔遗传不能证明发生染色体重排，应进一步研究染色体重排是否导致智力障碍（见注释 2）。需要更多标记物的基因分型、定量 PCR 和（或）FISH 分析结果支持此结论。另外，需要进行 FISH 分析区分新出现的重排与遗传性染色体不平衡、鉴别家庭中平衡性异常的携带者。目前这项检测已建议作为这些家庭的常规检查。

2. 材料

2.1 端粒微卫星的 PCR 扩增

1. 10ng/μL 的样品 DNA。

2. 10μmol/L PCR 引物（见表 1）：上游引物用 6-FAM、HEX 和 NED 中任选一种进行荧光标记，为减少反复冻溶，稀释成 10pmol/μL 的工作液并分装。

3. 10×浓缩 PCR 缓冲液：200mmol/L Tris-HCl pH 8.4，500mmol/L KCl。

4. 50mmol/L 氯化镁溶液。

5. dATP、dGTP、dCTP 和 dTTP 混合液（浓度均为 2mmol/L）。

6. 5U/mL Taq 聚合酶。

7. 耐热铝箔封口的 96 孔板。

8. PCR 热循环仪。

2.2 PCR 鉴定

1. 水平凝胶电泳装置，配有 6cm×10cm 成胶槽、梳子和 250V 电源。

2. 琼脂糖。

3. 10mg/mL EB 溶液。

4. 上样缓冲液。

5. 电泳缓冲液（1×TBE）：10.8g Tris 碱、5.5g 硼酸和 4mL 0.5mol/L EDTA pH 8.0，加水定容至 1L。

6. 紫外透射反射仪。

2.3 扩增产物的凝胶分析

1. Long Ranger™凝胶溶液（FMC；50%储存液）。

2. 尿素。

3. 0.45μm 滤膜。

4. 上样缓冲液。

5. *N*，*N*，*N*′，*N*′-四甲基乙二胺（TEMED）。

6. 过硫酸铵：10%水溶液。

7. GS-400 HD ROX。

8. ABI 377 自动测序仪，配有 GeneScan™ 及 Genetype™ 软件。

3. 方法

3.1 端粒卫星的 PCR 扩增

1. 将引物置于冰上融化后轻轻混匀，稍离心。

2. 对于每个标记物，准备 12 个反应的混合液包括：196μL 高压蒸馏水、

32.5μL 10×PCR 缓冲液、9.75μL 氯化酶、32.5μL dNTP 混合物、正反向引物各 2μL 和 1U Taq 酶，在冰上操作和保存。

3. 将上述 15μL PCR 反应混合液加到 10μL DNA 中，用铝箔胶盖密封 96 孔板。

4. 扩增前将 96 孔板放到热循环仪上，94℃变性 5min。

5. 循环条件为 94℃、30s，55℃、30s 和 72℃、45s，共进行 35 个循环，最后的延伸时间为 72℃、7min。样品可在−20℃保存备用。

3.2 PCR 鉴定

1. 凝胶电泳：取 3μL 上样缓冲液与 5μL PCR 产物混合，上样到含有5μg/mL EB 用 1×TBE 配制的 1.5%琼脂糖凝胶上。

2. 使用合适的分子质量标准，在 100V 电压下电泳 30min。

3. 将电泳后凝胶移到紫外透射反射仪上观察 DNA，确保微卫星的正确扩增。

3.3 扩增产物的凝胶分析

1. 按照 ABI 自动测序仪手册所列方法，把玻璃板和隔板放到指定的盒子里。

2. 将 3mL Long Ranger™凝胶溶液和 3mL 10×TBE 混匀，加 10.8g 尿素，溶解后加去离子水至 30mL，用 0.45μm 滤膜过滤。

3. 加入 150μL 10%的 APS 和 21μL TEMED 后倒胶，使凝胶聚合 1h。

4. 按说明书将凝胶盒装进测序仪。

5. 按表 2 所示在 PCR 扩增后将等量的每种扩增产物混合在一起（见注释 3)。

表 2　适合自动化荧光基因分型的成套 PCR 扩增双核苷酸重复微卫星标记物

	位点心	端粒	标记物	等位基因大小范围
第 1 套	D1S243	1p	FAM	142～170
	D1S2682	1q	NED	110～150
	D2S2268	2p	HEX	205～231
	D4S3038	4p	NED	195～240
	D3S3550	3q	FAM	230～270
第 2 套	D2S2338	2q	FAM	155～173
	D3S1270	3p	NED	154～196

续表

	位点心	端粒	标记物	等位基因大小范围
	D5S678	5p	NED	252～264
	D5S2006	5q	HEX	135～165
	D6S281	6q	HEX	203～219
第 3 套	D4S2930	4q	NED	216～236
	D6S1600	6p	FAM	165～210
	D7S2423	7q	HEX	230～270
	D8S1836	8q	HEX	121～160
	D9S1779	9p	NED	114～154
第 4 套	D7S2477	7p	FAM	132～180
	D8S504	8p	FAM	193～203
	D9S1838	9q	NED	155～175
	D11S968	11q	HEX	131～165
	D12S357	12q	HEX	260～315
第 5 套	D10S249	10p	NED	106～152
	D10S1700	10q	FAM	107～148
	D11S1363	11p	FAM	240～260
	D12S352	12p	HEX	145～170
第 6 套	D14S1007	14q	HEX	110～135
	D15S966	15q	HEX	225～265
	D16S521	16p	FAM	156～172
	D16S3407	16q	FAM	195～205
	D13S293	13q	NED	80～106
第 7 套	D17S1866	17p	FAM	144～195
	D17S928	17q	NED	76～96
	D18S59	18p	HEX	127～182
	D18S70	18q	FAM	115～135
	D19S886	19p	NED	105～165
第 8 套	D19S890	19q	HEX	190～210
	D20S864	20p	FAM	215～235
	D21S1911	21p	HEX	105～145
	D22S1169	22q	FAM	67～85
	DXYS233	Xp	HEX	260～300
第 9 套	D20S173	20q	HEX	135～195
	D21S1897	21q	FAM	178～224
	DXS8087	xq	FAM	270～300

6. 新鲜配制上样混合液：0.5μL GS-400 HD ROX、1μL 上样缓冲液和 5μL 去离子甲酰胺。

7. 将 2μL PCR 产物混合溶液与 3μL 上样混合液混匀。

8. 90℃变性 3min 后，快速放到冰上。

9. 将样点入胶孔中。

10. 应用运行 GS36D2400 模块搜集数据。

11. 按产品手册说明用 GeneScan™ 软件进行数据分析。

12. 用 GenoTyper™ 软件确定等位基因的大小。

4. 注释

1. 研究表明：细胞遗传学难以辨认的非平衡易位是导致 α-地中海贫血智力障碍综合征（ATR-16[16]）、Wolf-Hirchhorn 综合征[17]、Miller-Diecker 综合征[18]和猫叫综合征（cri-du-chat syndrome）[19]智力障碍的原因。

2. 用此方法可能会出现的问题是如何确定端粒重排导致的表型。当有一个以上的受累子代、端粒重排与智力障碍共分离时这种关系是明确的。在缺乏智力障碍家族史的条件下，当重排涉及以前智力障碍病例缺失的区域，或者当缺失片段非常大时，就可获得端粒重排的生物学效应证据。在其他病例中，确定小端粒重排的致病性可能更加艰难。

3. 为了使获得的所有位点峰高一致，可能需要调整每次混合的比率。

（王晓维 译，刘青杰 校）

参考文献

1. Rutter, M., Tizard, J., and Whitmore, K. (1970) Education, Health and Behaviour. Longman, London.
2. Crow, Y. J. and Tolmie, J. L. (1998) Recurrence risks in mental retardation. *J. Med. Genet.* **35,** 177–182.
3. Curry, C. J., Stevenson, R. E., Aughton, D., et al. (1997) Evaluation of mental retardation: recommendations of a consensus conference. *Am. J. Med. Genet.* **72,** 468–477.
4. Gustavson, K. H., Hagberg, B., Hagberg, G., and Sars, K. (1977) Severe mental retardation in a Swedish county: II, etiologic and pathogenetic aspects of children born 1959–1970. *Neuropediatry* **8,** 293–304.
5. Elwood, J. H. and Darragh, P. M. (1973) Severe mental handicap in Northern Ireland. *J. Mental. Defic. Res.* **25,** 147–155.
6. Flint, J., Wilkie, A. O. M., Buckle, V. J., Winter, R. M., Holland, A. J., and McDermid, H. E. (1995) The detection of subtelomeric chromosomal rearrangements in idiopathic mental retardation. *Nat. Genet.* **9,** 132–140.
7. Knight, S. J. L., Horsley, S. W., Regan, R., et al. (1997) Development and clinical application of an innovative fluorescence *in situ* hybridization technique which detects submicroscopic rearrangements involving telomeres. *Eur. J. Hum. Genet.* **5,** 1–8.

8. Knight, S. J. L., Regan, R., Nicod, A., et al. (1999). Subtle chromosomal rearrangements in children with unexplained mental retardation. *Lancet* **54,** 1676–1681.
9. Ledbetter, D. H. and Ballabio, A. (1995) Molecular cytogenetics of contigous gene syndromes: Mechanisms and consequences of gene dosage imbalances; In *The metabolic and molecular bases of inherited disease. Vol 1.* (Scriver, C. R., Beaudet, A. L., Sly, W. S., and Valle, D., eds.), McGraw-Hill, New York, pp. 811–839.
10. Mazzarella, R. and Schlessinger, D. (1998) Pathological consequences of sequence duplications in the human genome. *Genome Res.* **8,** 1007–1021.
11. Kallionemi, A., Kallionemi, O. P., and Sudar, D. (1992) Comparative Genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* **258,** 818–821.
12. Du Manoir, S., Speicher, M. R., Joos, S., et al. (1993) Detection of complete and partial chromosomal gains and losses by comparative genomic *in situ* hybridization. *Hum. Genet.* **90,** 590–610.
13. Ghaffari, S. R., Boyd, E., Tolmie, J. L., Crow, Y. J., Trainer, A. H., Connor, J. M. (1998) A new strategy for cryptic telomeric translocation screening in patients with idiopathic mental retardation. *J. Med. Genet.* **35,** 225–233.
14. Slavotinek, A., Rosenberg, M., Knight, S., et al. (1999) Screening for submicroscopic chromosome rearrangements in children with idiopathic mental retardation using microsatellite markers for the chromosome telomeres. *J. Med. Genet.* **36,** 405–411.
15. Colleaux, L., Rio, M., Heuertz, S., et al. (2001) A novel automated strategy for screening cryptic telometric rearrangements in children with idiopathic mental retardation. *Eur. J. Hum. Genet.* **9,** 319–327.
16. Wilkie, A. O., Zeitlin, H. C., Lindenbaum, R. H., et al. (1990) Clinical features and molecular analysis of the alpha thalassemia/mental retardation syndromes. I. cases due to deletions involving chromosome band 16p13.3. *Am. J. Hum.. Genet.* **46,** 1112–1126.
17. Goodship, J., Curtis, A., Cross, I., et al. (1992) A submicroscopic translocation, t(4;10), responsible for recurrent Wolf-Hirschhorn syndrome identified by allele loss and fluorescent in situ hybridization. *J. Med. Genet.* **29,** 451–454.
18. Kuwano, A., Ledbetter, S. A., Dobyns, W. B., Emanuel, B. S., and Ledbetter, D. H. (1991) Detection of deletions and cryptic translocations in Miller-Diecker syndrome by *in situ* hybridization. *Am. J. Hum. Genet.* **49,** 707–714.
19. Overhauser, J., Bengtsson, U., McMahon, J., et al. (1989) Prenatal diagnosis and carrier detection of a cryptic translocation by using DNA markers from the short arm of chromosome 5. *Am. J. Hum. Genet.* **45,** 296–303.

第 14 章　微阵列 CGH

Ben Beheshti，Paul C. Park，
Ilan Braude，Jeremy A. Squire

1. 引言

中期分裂相染色体的比较基因组杂交[1,2]非常有助于我们理解相当复杂的恶性肿瘤（如实体瘤）的肿瘤细胞遗传学[3,4]。这种以分子细胞遗传学为基础的实验方法（以下称“染色体 CGH”）能够在一次实验中，对比待检样品细胞和正常参考细胞，确定基因组范围内的 DNA 拷贝数失衡。染色体 CGH 极大地增进我们对肿瘤生物学和肿瘤发展的理解，因为重复多次发生扩增或缺失的最小染色体区域很可能分别含有新的原癌基因或肿瘤抑制基因。

染色体 CGH 的独特优点在于它的全基因筛查功能，与检测单一靶 DNA 剂量改变的低通量方法，如 Southern 分析、PCR 和荧光原位杂交（FISH）相比，速度显著提高且省力。目前染色体 CGH 是一种比较完善的分子细胞遗传学方法，但是它的两个缺陷限制其作为一种综合性筛查工具的应用。第一，因为靶 DNA 在染色体中是高度浓缩和超螺旋的，CGH 确定拷贝数缺失的分辨率不低于 10Mb[1]。CGH 可以检测到拷贝数增加的 DNA 片段至少大于 2Mb，这取决于扩增子大小和拷贝数[1,5]。这样的分辨率，尽管能够提供作为定位克隆研究的出发点，但仍然包含过多的基因，无法精确定位有意义的序列。第二，对染色体获得的 CGH 图像进行分析只是半自动化，要求经验丰富的细胞遗传学家鉴别每条染色体，确定失衡区域。

近来建立的微阵列方法克服了染色体 CGH 的一些缺陷。互补 DNA 微阵列（cDNA 微阵列）技术，通过人类基因组计划和自动化阵列玻片点样技术的发展而实现的，有助于高通量分析肿瘤的各种基因表达[6~8]。一种新出现的实验平台针对染色体 CGH 的缺点，结合微阵列表达（microarray expression）技术，通常称为“微阵列 CGH”。不用中期染色体，采用结合在玻片上的短序列 DNA 微阵列（本章中称为杂交的“靶”）和感兴趣的基因组片段（本章中称为杂交的“探针”）进行 CGH（见注释 1）。由于在微阵列上的 DNA 有足够的代表性，该系统显著提高了定位染色体失衡区域的分辨率。另外，与表达微阵列筛查一样，分析结果直观、自动化。近来在发表论文中出现的两种技术平台：①cDNA 阵列 CGH[9,10]；②基因组 DNA 阵列 CGH（也称为“矩阵 CGH”和“阵列 CGH”）[11,12]。本章将对目前的实验方法进行概述，但是请读者注意，微阵列 CGH 作为一种新兴的实

验技术，下面描述的实验方法仍可能在不断改进中。要获得最新的实验方法，请登录 http://www.utoronto.ca/cancyto/。

1.1 cDNA 阵列 CGH

采用 cDNA 靶的微阵列 CGH（以下称“cDNA 阵列 CGH”）最早由Pollack 等提出[9]。该平台运用通常用于表达筛查的传统 cDNA 微阵列检测基因组拷贝数失衡。如图 1 所示，优点在于可以用双份靶阵列进行平行实验，对同一组织中表达和拷贝数变化进行全面的总结[9]。越来越多的各种 cDNA 微阵列表达模板意味着实验方案的改进，用 CGH 方法检测这些靶 cDNA，迅速得到基因剂量改变的高通量分析结果。

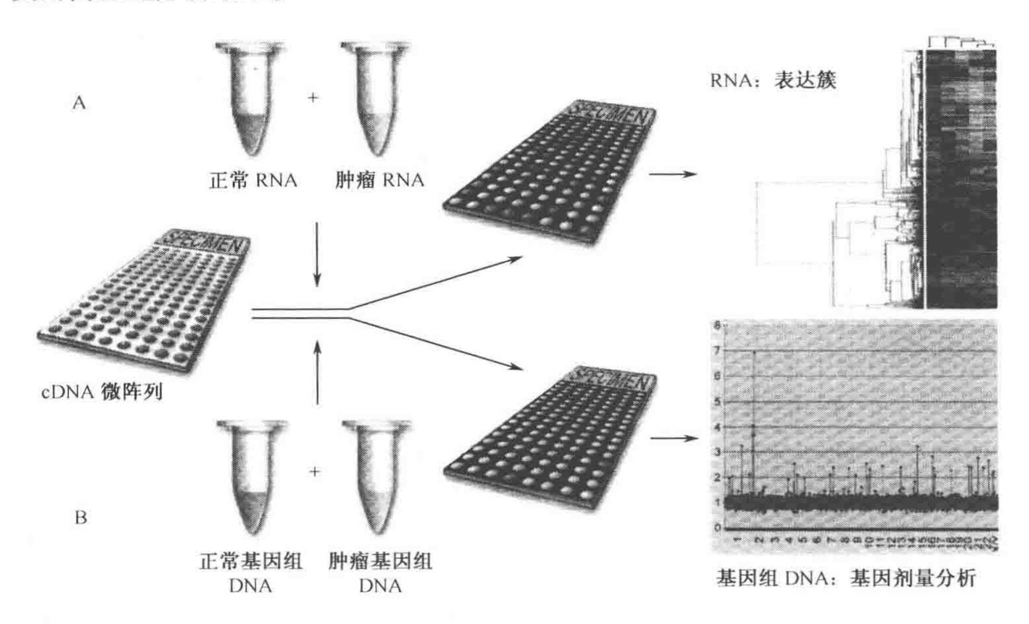


图 1　将 cDNA 微阵列用于微阵列表达和 CGH 分析的图示说明。cDNA 微阵列用来自正常人（Cy5）和肿瘤组织（Cy3）的 RNA 和（或）DNA 标记探针进行筛查。分析红：绿信号强度比率分别显示（A）基因表达水平或（B）基因剂量改变水平。为更好地解释结果，需要数据最小化技术进行分析。(A) 二维等级簇[32,37]应用在结果中，鉴别基因表达模式和建立临床相关性。(B) *in silico*（硅芯片）cDNA 染色体定位和按顺序排列使 cDNA 阵列 CGH 结果显示全染色体组的示意图样曲线，有助于鉴定基因剂量改变的区域。

1.1.1　cDNA 阵列 CGH 在肿瘤基因组学中的应用

Pollack 等用 3360 个点的微阵列进行 cDNA 阵列 CGH，检查乳腺癌细胞系和组织[9]。证实该技术能够有效的检测拷贝数增加和单一缺失。对肿瘤组织和

细胞系分析的结果表明不是所有的扩增基因都过度表达，绝大多数的过度表达基因没有发生扩增；然而，观察发现这些基因中的亚组，包括 ERBB2，同时发生扩增和过度表达。他们提出这些基因可能在肿瘤启动和进展中起重要的调节作用。

最近，Heiskanen 等运用 cDNA 阵列 CGH 检测基因扩增[13]。在此项研究中，将具有已知的基因扩增的细胞系来检测该技术的敏感性检测限值。不同于其他报道[9,10]，基因组 DNA 用生物标记，该研究采用一种酪胺扩增技术[13,14]将来自成神经细胞瘤细胞系 NGP 的基因组 DNA 从 100%到 2%梯度稀释后标记，相应的微阵列中 MYCN 信号强度随浓度的降低而降低。该方法准确检测到 5 倍或更多的扩增。在 2%稀释度下，观察到 MYCN 强度为其他未扩增基因的 2.5 倍。然而，这种方法的主要缺陷在于不能进行双色 CGH，因此每次实验中必须准备两份微阵列（实验和对照）。

近来，我们证明 cDNA 阵列 CGH 适用于患者样本的基因扩增的筛查[10]。在该项研究中，通过对高密度 19 200 个点样的微阵列进行 cDNA 阵列 CGH 实验证实了 MYCN（染色体 2p24 区域）在成神经细胞瘤患者和细胞系中的扩增程度。在细胞系 IMR32 中，cDNA 阵列 CGH 证实最近描述为共扩增原癌基因的 MEIS1[15,16]。重要的是，之前没有任何研究指出该技术能够分辨患者样本的 3 种肿瘤基因型（图 2）。该研究证实可以检测数千个基因的 cDNA 阵列 CGH 技术不仅比起常规实验方法，如 FISH 和 Southern 分析具有高通量的优点，而且比染色体 CGH 提高了分辨率。

在 Pei 等的另一项研究中[17]，证实在儿科癌症中对扩增子边界进行描述时 cDNA 阵列 CGH 分辨能力较高。这篇论文清楚地指出，与 cDNA 阵列 CGH 相比，染色体 CGH 的分辨能力极为有限。这些结果见图 3。

1.1.2 cDNA 阵列 CGH 目前的局限性

目前 cDNA 阵列 CGH 存在至少 3 个缺陷。首先，比起基因组序列，靶 cDNA序列的复杂程度低，缺少内含子和其他非转录序列如重复 DNA 和控制序列。因此，基因组 DNA 的许多区域因为相互影响无法进行效率一致的杂交，因此实验特异性较低、重复性差。其次，靶 cDNA 序列长度一般只有 0.5～2kb[9,10,13]，比最小的染色体低许多个数量级，比起细菌人工染色体（BAC）、P1-来源人工染色体（PAC）和黏粒的基因组插入序列也低 1～2 个数量级。尽管采用相应大小的探针可以进行微阵列的表达谱研究，但当采用标记的基因组 DNA 探针时，将导致信号敏感性的降低。尽管 Pollack 等[9]认为对拷贝数增加或减少 cDNA 阵列 CGH 都能检测，但 cDNA 阵列应用于检测单拷贝改变（包括拷贝缺失）很可能不够精确。最后是 cDNA 微阵列制备技术的缺陷，也同样影响了 cDNA 阵列 CGH 技术。目前相当数量的商品克隆的基因被错误定义[18]，

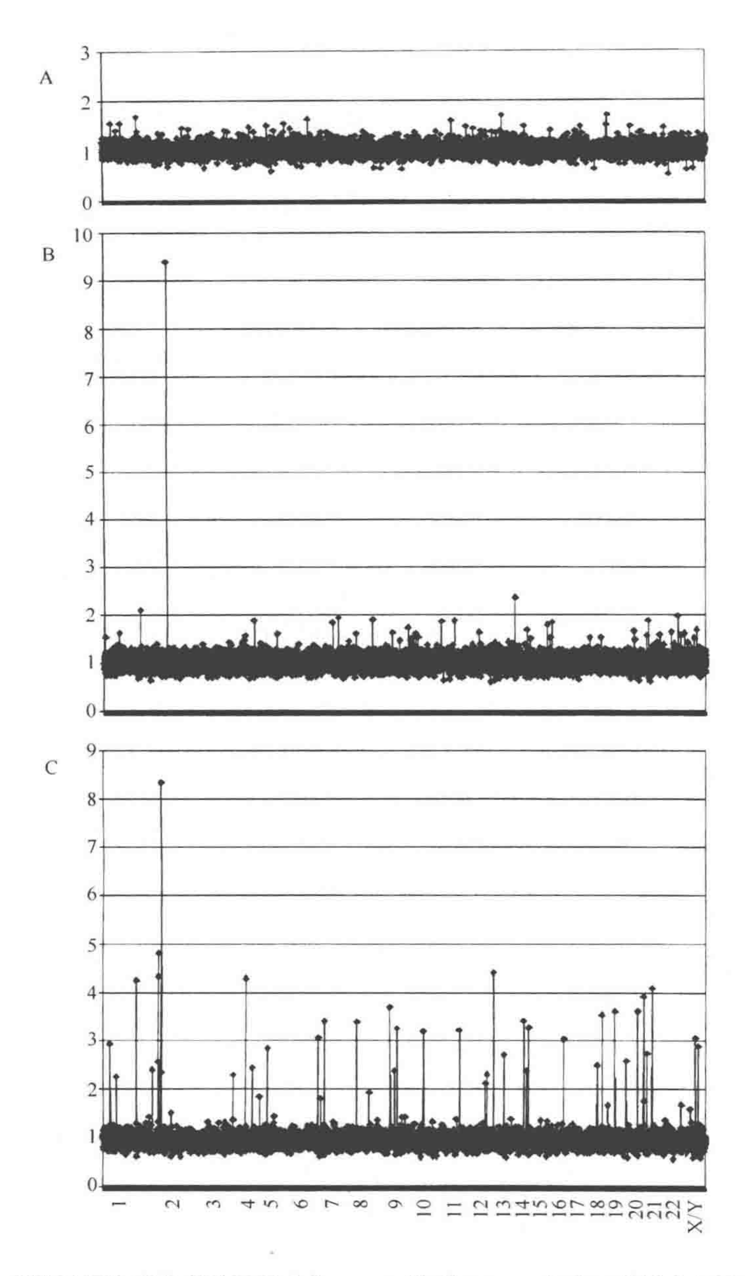


图 2　成神经细胞瘤患者进行标准化 cDNA 阵列 CGH，鉴定三种肿瘤基因型：(A) 基因组 DNA 中没有高拷贝的获得或扩增。(B) MYCN 扩增是唯一的基因组拷贝数失衡。(C) MYCN 扩增和之前未检测到的 2p24 基因共扩增，线粒体 DNA 序列和许多其他基因高拷贝数增加，提示潜在的遗传不稳定性。第三种临床基因型之前未曾描述过，因为这些区域通过染色体 CGH 无法分辨[10]。

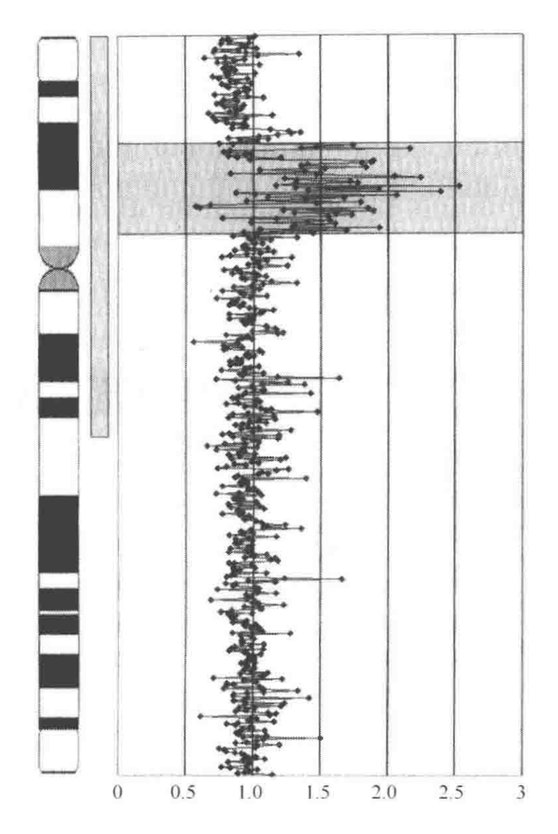


图3 采用高密度 cDNA 阵列 CGH 高分辨检测 17 号染色体基因剂量改变。染色体 CGH 检测到一例骨肉瘤样本中 17p-17q21 区域（垂直的灰色长条）的高拷贝增加。采用同一样本基因组 DNA 进行相应的标准化 cDNA 阵列 CGH 发现 17p12-17p11.2 扩增区域的界限（水平灰色长条）。染色体示意图通过 *in silico* 上的微阵列 cDNA 分配到各个染色体，将 cDNA 沿染色体进行序列排列而构建[10]。

可能表现为错误鉴定序列、错误染色体定位，甚至是 cDNA 靶中出现完全不存在的人类序列（可能因为克隆污染、非同源序列造成）。在实际操作中，同时用其他方法进行实验，这些缺陷可能表现为结果或发现可能被其他方法证实。为了排除此问题，商品化克隆资源和可制备阵列的研究机构应对所有的克隆进行测序。总之种种缺陷导致了报道中 cDNA 阵列 CGH 的假阳性（15%）和假阴性（15%）结果[9]。

1.2 阵列 CGH

第二类微阵列 CGH 平台（以下称为“阵列 CGH”）采用基因组 DNA 序列作为微阵列上的靶 DNA。阵列 CGH 首先由 Solinas-Toldo 等建立[11]，经 Pinkel

等改良[12]。根据这些研究报道，微阵列中的DNA靶可能来自比染色体低几个数量级的各种基因组克隆，包括酵母人工染色体（YAC，0.2～2Mb）、BAC（不超过300kb）、P1（70～100kb）、PAC（130～150kb）和黏粒（～30-45kb）。比起染色体CGH，靶DNA大小的降低提高了检测拷贝数失衡的分辨能力（图4）。由于靶DNA与相应的染色体CGH的结构复杂度存在差异，必须改进杂交条件[11,12]。阵列CGH优于cDNA阵列CGH之处在于DNA靶的复杂程度较高、跨区域大、含有内含子和其他非转录基因组序列，保证杂交的一致性和信号的高保真。

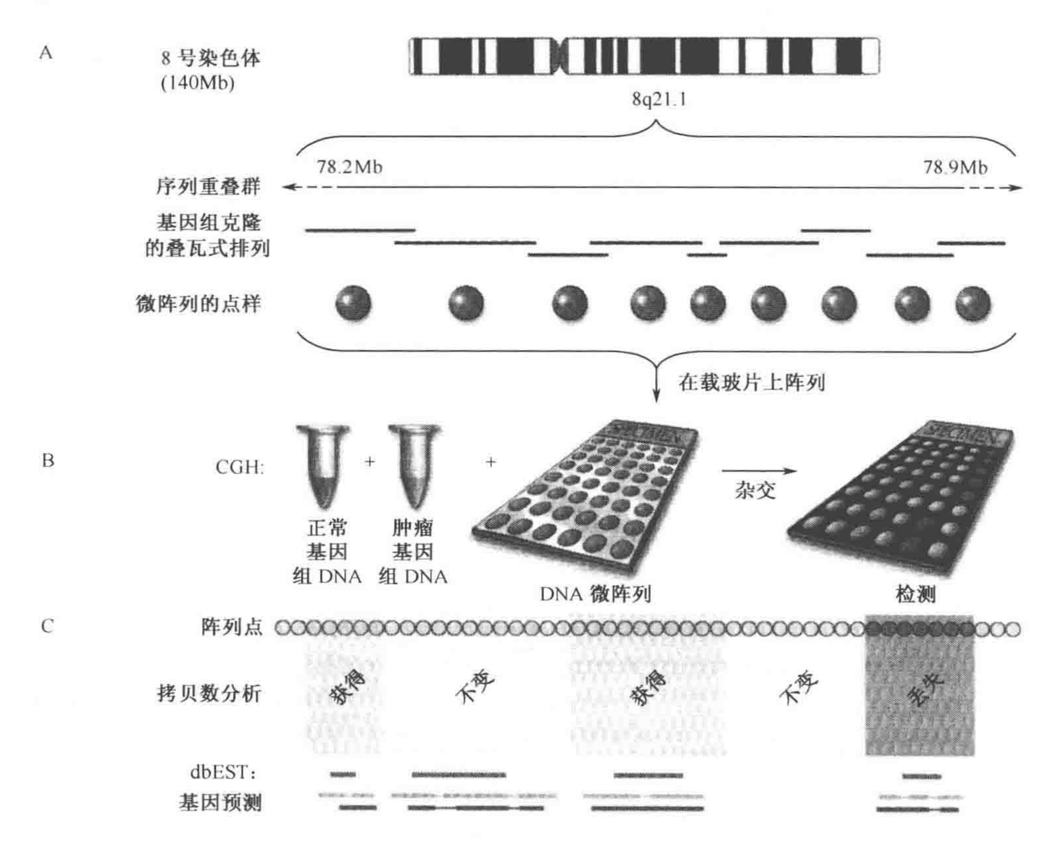


图4 用阵列CGH技术沿感兴趣的区域集中分析拷贝数失衡的示意图（如8q21.1）。(A）覆盖整个区域的基因组克隆（如BAC、PAC、P1、黏粒）的叠瓦式排列。提取纯化后，这些基因组靶DNA在玻璃载片上阵列点样。(B）阵列CGH通过标记正常人（Cy3）和肿瘤（Cy5）基因组DNA与微阵列杂交，用微阵列扫描仪来检测。(C）每个阵列样点，按照相应的tiling path作为独立的、连续性图谱在*in silico*上重新排列，通过荧光比率分析，鉴定该区域的拷贝数改变。这些结果与*in silico*技术结合，鉴定有意义的候选基因。

1.2.1 阵列 CGH 在肿瘤基因组学中应用

目前，一些研究小组发表了阵列 CGH 的实验结果[11,12,19～25]。Pinkel 等[12]检测到乳腺癌 20 号染色体一个亚带的基因组失衡，这是用染色体 CGH 检测不到的。用阵列 CGH 技术，对位于 20q13.2 的扩增子边缘进行准确的基因定位[19]。这使 CYP24 定位在最小的扩增区域，进而确定 CYP24 为新的乳腺癌候选原癌基因。在另一研究中，将阵列 CGH 用于检查成纤维神经瘤 2 型患者（NF2），确定位于染色体 22q 的 NF2 位点周围的缺失范围和缺失概率[20]。微阵列由 NF2 周围 7Mb 范围内 104 个叠瓦式排列的 BAC 和 PAC 克隆构成，并包括能以较高的分辨率确定拷贝数变化较小的黏粒。用此系统在患者样本中检测到单拷贝缺失和纯合子缺失（图 5)。进一步完善使得阵列 CGH 还可以用档案样本的基因组 DNA 进行回顾性分析。Daigo 等[21]采用激光显微切割(Arcturus, Mountain View, CA; http://www.arctur.com)、福尔马林固定、石蜡包埋的肿瘤样本，将提取的 DNA 进行寡聚核苷酸引物-PCR（DOP-PCR)[26]，对全基因组进行扩增，然后进行阵列 CGH 以获得扩增曲线。

1.2.2 在其他领域的应用

微阵列 CGH 是一种通用的技术，可以用于检测肿瘤以外的遗传性疾病。Geschwind 等[23]最近的研究中用微阵列 CGH 技术研究人类大脑半球偏侧性的分子机制。采用覆盖性染色体假性常染色体区域的黏粒构建的一套 DNA 微阵列，来检测 Klinefelter 综合征患者（核型：XXY）的基因剂量变化，结果与异常优势及其他认知或行为表型存在相关性。

1.2.3 当前基因组 DNA 阵列制备中的问题

虽然阵列 CGH 仍然存在一些局限性，且大多数与阵列制备有关，但随着技术的成熟就会被解决。对目前的阵列制备系统进行改进是可能的，目前生产的局限性主要是自基因组克隆中自动化批量提取 DNA 的困难。例如，发表的阵列 CGH 研究中的 DNA 提取方法诸如 DNA 大量提取试剂盒（Qiagen）和酚/氯仿抽提都很烦琐[11,12]。然而商品化批量提取试剂盒（如 R. E. A. L. System™, Qiagen）结合 DOP-PCR 可以为操作自动化提供帮助（见注释 2)。第二个困难在于生产足够多的 DNA 用于批量生产微阵列。cDNA 表达克隆具有通用引物位点可供进行大规模 PCR 合成基因和表达序列标签，随后进行纯化和阵列制备；基因组克隆却无法这样做。另外，比较大的基因组插入片段需要进行更加严格扩增条件[27]的长 PCR，在模板中的重复 DNA 序列会造成混杂[28]。第三个困难是溶液中大片段基因组序列具有黏性，可能造成一些阵列点样嘴阻塞，而新的分离嘴设计可能缓和这个问题。最后，像 cDNA 阵列一样，也可能有少数但有意义的

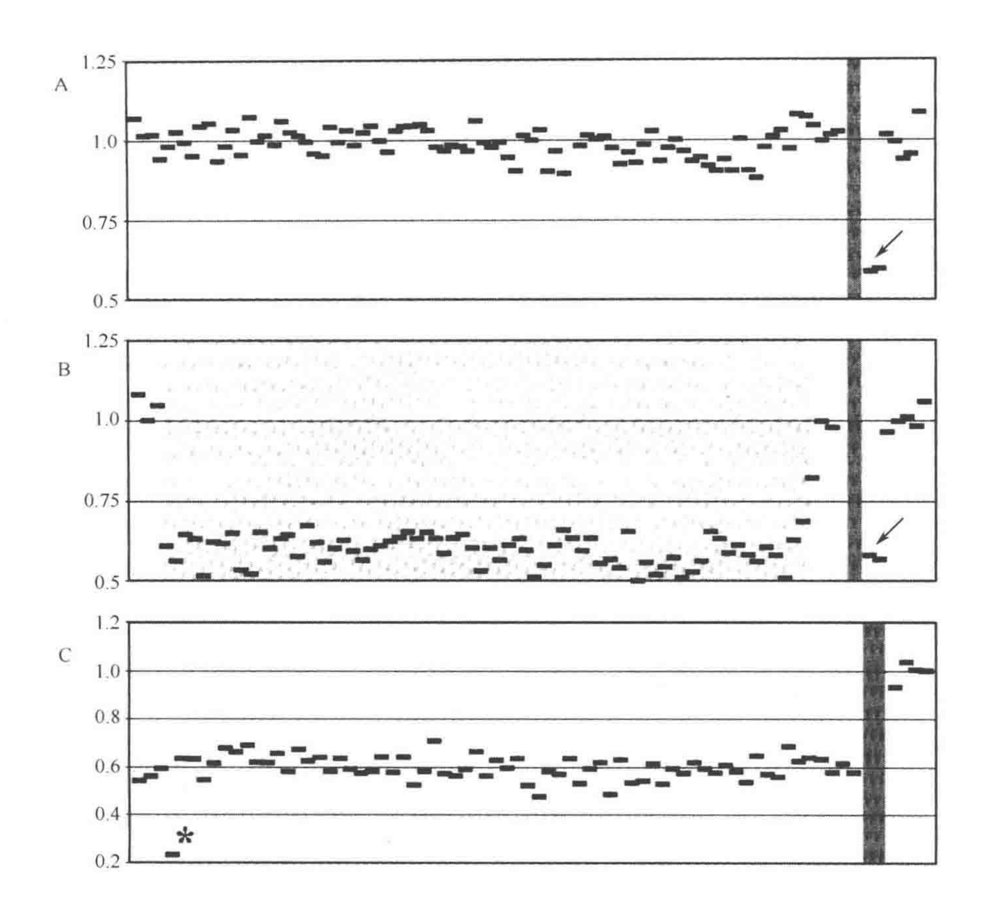


图 5　柱状图显示构成染色体 22q 的 7Mb 大小的一系列基因组克隆拷贝数，从左到右代表从着丝粒到端粒方向。每个黑色条代表一个基因组克隆。染色体 X、Y 对照基因组克隆（灰色条）分开在柱状图右侧。（A）阵列 CGH 比较正常男性和女性 DNA，显示预想的染色体 X 克隆发生单拷贝缺失。（B）比较男性 NF2 患者与女性对照，描绘出沿 NF2 位点相邻区域杂合性缺失的边界和周围区域（斜线区域）。（C）比较杂合体女性 NF2 患者与正常女性对照，在单拷贝缺失区域中检测到纯合性中间缺失（星号），表明阵列 CGH 的敏感性和分辨率。该技术的准确性反映在比率与预期值的偏差。在征求同意的情况下，图片改编于 Bruder 等 2001 年的文献[20]。

一些商品化基因组克隆没有正确定位（如因为克隆盘污染或标记错误）。目前的解决方法是用 FISH 实验证实的细胞遗传学定位的克隆进行阵列 CGH，虽然处理几十以至几百个基因组克隆可不是简单的工作。将在第 27 章进一步阐述的 BAC/PAC 资源库（http://www.chori.org/bacpac/）是一项正在进行的用 FISH 定位所有克隆的计划[25]，这将在很大程度上解决这个问题。

1.2.4 基因组 DNA 阵列的目前获得途径

尽管 cDNA 微阵列可以购买成品或在研究所用阵列制备核心工具制备，但对大多数研究者来说阵列 CGH 仍然不能很快得到。目前，想要对感兴趣的染色体区域进行阵列 CGH 研究的科研人员需要定做。人类基因组计划的进展推动了覆盖染色体有意义位点基因组克隆的叠瓦式排列图谱的建立（如美国国家生物技术信息中心的 MapViewer 资源，http://www.ncbi.nlm.nih.gov/）。然而制备基因组 DNA 阵列需要的相关费用对单个实验室来说是太过昂贵，是不切实际的，研究所用阵列制备核心工具可能对已有产品进行改进以满足实验需求。可以想像，后基因组时代将推动全基因组阵列的产生[29]，甚至产生高分辨染色体特异性或染色体条带特异性微阵列。令人瞩目的是第一个全基因组微阵列（大约 2000 个 BAC 克隆）不久前已经成功建立[25]，并显示在基因组范围内对肿瘤细胞的部分非整倍体断裂点进行准确描述。

1.2.5 基因组 DNA 阵列的商业来源

基因组靶定做阵列的替代途径是直接购买商品化基因组阵列。有一种这样的商品化阵列 GenoSensor System™ 由 Vysis 公司生产（http://www.vysis.com）。Vysis 生产的 AmpliOnc I™ 阵列含有来自 59 种已知的原癌基因的 BAC、PAC 和 P1 基因组克隆的 3 套阵列[30]，已被多个研究小组用于乳腺癌[21]和神经胶质胚细胞瘤多样性[24]的研究。AmpliOnc I™ 阵列是 GenoSensor System™ 阅片和分析软件的补充。Vysis 的下一代基因组微阵列由 250～300 个点样组成，包括来自 AmpliOnc I™ 阵列、所有染色体的亚端粒区域、主要抑癌基因、主要微小缺失综合征位点的基因组克隆[30]。Spectral Genomics 公司（http://www.spectral-genomics.com）最近出品了人类全基因组 BAC 微阵列试剂盒，该微阵列是由 1003 个相隔一定基因组距离的 BAC 克隆构成的 2 套阵列，检测染色体异常的有效分辨率达到 3Mb。可以预期在不久的将来，市场上将会出现高分辨率（1Mb 或更小）的人和鼠 BAC 微阵列。

1.3 检测和分析

微阵列 CGH 分析包括三个方面：①图像捕捉；②荧光强度的定量；③结果判定。可以用以表达微阵列为基础建立的系统进行微小修改或不修改后用于这些工作。

1.3.1 图像捕捉

微阵列 CGH 的图像捕捉要求对微阵列上的所有小格状点样进行系统的扫

描。市场上的微阵列扫描仪通常是可以依次（如 Packard BioScience，http://www.packardbiochip.com）或同时（如 Virtek Vision Inc，http://www.virtek.ca；Axon Instruments Inc.，http://www.axon.com）捕捉两种不同波长的激光扫描系统。另外，也有商品化的可自行组装的微阵列扫描系统资源（如 http://brownlab.stanford.edu/[31]）。这些系统的技术细节与各种硬件装置相特异，不在本章的讨论范围内。

1.3.2 荧光定量和比率分析

分析阵列点样的荧光定量和比率分析的软件通常随扫描仪硬件一起包装。另外，也可得到不太成熟的公众用软件（ScanAlyze：http://rana.stanford.edu；[32]）。定量荧光强度需要建立荧光比率基线并标准化。阵列中每个点样小格经常需要重复两三次来评估结果的可重复性。建议用来自已知未发生拷贝数变化的染色体区域的基因组克隆作为阵列 CGH 实验的内对照。另外，用不同荧光标记的正常基因组 DNA 进行平行实验作为自身的对比，以检验建立实验体系的特异性。总之，对结果的一致性进行统计学分析是必需的[33]。例如，那些用于表达微阵列实验的通用标准化方法也可以用于建立底线阈值[10,34]。

此前的报道指出荧光比率和拷贝数改变之间的关系[1,9,11,12]偏离了低拷贝数时造成的荧线性。因此，用户独立建立这种关系用来判定 CGH 结果和确认 FISH 分析组织切片的染色体失衡结果是非常重要的。

1.3.3 生物信息学在微阵列 CGH 中的作用

随着微阵列密度的提高增加了代表性，数据存储[35]和生物信息学将成为 CGH 分析的重要方面。另外，分辨率的提高使得识别样本中基因组失衡高发区域一致性的工作更具挑战意义。总之，能处理实验间许多多维数据点数据的最小化技术是必要的。而且，cDNA 阵列 CGH，确定 *in silico* cDNA 靶的染色体位点对提供全面的染色体拷贝数改变的模式图样图解（图 3[10]）是必要的。随着阵列 CGH 技术逐渐推广，将会出现更标准的信息学和分析工具。

2. 材料

2.1 cDNA 阵列 CGH

2.1.1 阵列制备

1. 20×SSC：溶解 175.32g 的 NaCl、88.23g 的二水柠檬酸钠于 1L 水中，调 pH 至 7.0。室温保存。

2. cDNA 阵列，室温干燥保存。

3. 封闭液：3%牛血清白蛋白（BSA）、4×SSC、0.1% Tween-20。-20℃保存。

4. 玻璃盖片。

2.1.2 随机引物标记基因组 DNA 进行探针制备

1. 高分子质量基因组 DNA。
2. *Eco*R I 或 *Dpn* II（New England Biolabs）。
3. Qiaquick PCR 纯化试剂盒（Qiagen）。
4. BioPrime 标记试剂盒（Gibco-BRL），-20℃保存。
5. dNTP 混合液：dATP、dCTP、dTTP 各 4.8mmol/L。
6. 2.4mmol/L dCTP。
7. 1mmol/L Cy5-dCTP、Cy3-dCTP（Amersham），-20℃避光保存。
8. Micrcon 30 滤器（Amicon）。
9. 酵母 tRNA（Gibco-BRL），-80℃保存。
10. Poly（dA-dT）（Sigma），-20℃保存。
11. Cot-1 DNA（Gibco-BRL）。
12. 杂交缓冲液：3.4×SSC/0.3% SDS，新鲜配制。

2.1.3 探针变性和杂交

1. 橡皮泥。
2. 杂交炉。

2.1.4 洗脱

1. 加热的水浴锅。
2. 染色缸。
3. 玻片离心机。

2.2 阵列 CGH

2.2.1 阵列制备

1. 从基因组克隆中提取和纯化 DNA。
2. Maxiprep DNA 提取试剂盒（Qiagen）。
3. 玻璃载玻片。
4. 玻璃毛细管或自动点样器。
5. 封闭液：10μg/μL 鲑鱼精子 DNA（Life Technologies）溶于 50%甲酰胺

(Gibco-BRL)，10%硫酸葡聚糖，2×SSC，0.2% SDS，0.2% Tween-20 中，-20℃保存。

2.2.2 缺口平移法标记基因组 DNA 制备探针

1. 高分子质量基因组 DNA。
2. DNA 聚合酶 I (Roche)。
3. DNase I (Gibco-BRL)。
4. 10×Cy3-dNTP：0.1mg/mL BSA (Sigma)、0.1mol/L β-巯基乙醇 (Sigma)、0.5mol/L Tris-HCl、50mmol/L $MgCl_2$、0.08mmol/L Cy3-dCTP (Amersham)、0.2mmol/L dATP、0.12mmol/L dCTP、0.2mmol/L dTTP、0.2mmol/L dGTP；溶于水，pH 7.4，-20℃避光保存。
5. 10×Cy5-dNTP：0.1mg/mL BSA (Sigma)、0.1mol/L β-巯基乙醇 (Sigma)、0.5mol/L Tris-HCl、50mmol/L $MgCl_2$、0.08mmol/L Cy5-dCTP (Amersham)、0.2mmol/L dATP、0.12mmol/L dCTP、0.2mmol/L dTTP、0.2mmol/L dGTP；溶于水，pH 7.4，-20℃避光保存。
6. DNase I 稀释液：50mmol/L Tris-HCl、5mmol/L $MgCl_2$、1mmol/L β-巯基乙醇、100μg/mL BSA；溶于水，pH 7.4，-20℃避光保存。
7. DNA 大小标准梯度。
8. 0.3mol/L EDTA (Gibco-BRL)。
9. 交联葡聚糖 G-50 柱子。
10. Cot-1 DNA (Gibco-BRL)。
11. 杂交缓冲液：50%甲酰胺，10%硫酸葡聚糖，2×SSC，2% SSC，-20℃保存。

2.2.3 探针变性和杂交

杂交炉。

2.2.4 洗脱

1. 加热水浴锅。
2. 0.1mol/L 磷酸钠缓冲液。
3. NP-40 (Vysis)。

3. 方法

3.1 cDNA 阵列 CGH

3.1.1 阵列制备

与变性探针杂交前，先用封闭液（盖上盖片）在 37℃封闭 cDNA 阵列 1h

(见注释 3)。

3.1.2 随机引物标记基因组 DNA

1. 肿瘤和正常组织基因组 DNA 各 2μg 分别用 *Dnp*II 消化 1～1.5h（见注释 4～6）。将消化产物进行纯化（Qiaquick PCR 试剂盒）、真空干燥，用 25μL 水重悬。

2. 使用 Bioprime 标记试剂盒基本按说明书进行随机引物标记，稍作改动。100℃变性 DNA 和 20μL 随机引物（试剂盒中含有）5min，迅速放于冰上冷却，并加入 2.5μL dNTP、1.25μL dCTP、1μL Cy3/Cy5-dCTP、1μL Klenow 片段（试剂盒中含有），37℃孵育 90min。

3. 混合 Cy3 和 Cy5 标记产物，上样到 Micrcon 30 滤器。2000*g* 离心 10min，检查样品容器确定标记产物的存在（紫色）。直接加入 30μg Cot-1 DNA、100μg 酵母 tRNA、20μg poly（dA-dT），5000*g* 离心 20min。为了重新收集样品，加入 15μL 杂交缓冲液，将 Micrcon 30 滤器倒置放入新的收集管，16 000*g* 离心 1min。

3.1.3 探针变性和杂交

1. 在加热的水浴锅或 PCR 仪上 100℃变性探针 90s，冰上冷却探针后，在 37℃复性 0.5～1h。

2. 将探针加到微阵列上，盖上玻璃盖片并用橡皮泥封片。在 65℃用杂交缓冲液湿润的湿盒中杂交 16～20h（见注释 3 和 7）。

3.1.4 洗脱

1. 将 cDNA 微阵列于 2×SSC、0.03% SDS 中 65℃（见注释 7）洗 5min，接着用 1×SSC、0.2×SSC 室温下各洗脱 5min。

2. 低速（50*g*）离心 5min 使标本片干燥。

3.2 阵列 CGH

3.2.1 阵列制备

1. 基因组克隆（BAC、PAC、黏粒等）在相应抗生素存在的条件下生长，并用商业化试剂盒大量提取基因组 DNA，一般得到 10μg 数量级的产物。用酚/氯仿的标准化程序进一步纯化 DNA（见注释 2）。

2. DNA 大小和质量在 1% 琼脂糖凝胶电泳上评估，用 UV 光度计定量 DNA。

3. 靶 DNA 经超声波破碎得到 1.5～15kb 片段，沉淀、重悬至适宜浓度，用

毛细管以 200～400μm 直径点样到玻璃载片上（见注释 8）。

4. 向阵列上加上 20μL 封闭液，盖上盖片，37℃湿盒复性 1h（见注释 3 和 9）。

3.2.2 用缺口平移法标记基因组 DNA 制备探针

1. 肿瘤和正常组织基因组 DNA 各 2μg 分别用缺口平移法进行标记（见注释 5），反应混合物如下：

A）Cy3 反应物（加水至总体积 100μL）：

（1）肿瘤基因组 DNA：2μg。

（2）10×Cy3 dNTP：10μL。

（3）DNA 聚合酶 I：1μL。

（4）DNase I（见注释 10）。

B）Cy5 反应物（加水至总体积 100μL）：

（1）正常人基因组 DNA：2μg。

（2）10×Cy5 dNTP：10μL。

（3）DNA 聚合酶 I：1μL。

（4）DNase I（见注释 10）。

2. 16℃标记反应 1.5h 后，将标记反应混合物放于冰上。

3. 标记产物的大小在 1%琼脂糖凝胶电泳进行评估（见注释 11），进行 CGH 实验的理想片段长度在 500～2000bp 范围内。如片段过长，在反应混合物中加入适量的 DNA 聚合酶 I 和 DNase I，在 16℃继续反应（见注释 11）。

4. 向标记反应混合物中加入 0.1 倍体积的 0.3mol/L EDTA 终止反应。

5. 用 Sephadex G50 离心柱除去标记混合物中未掺入的核苷酸。

6. 混合两种标记探针，加入 50μg Cot-1 DNA、0.1 倍体积的 3mol/L 乙酸钠、2 倍体积的冰冷 100%乙醇沉淀探针。用 70%乙醇洗涤沉淀、晾干，然后用 20μL 杂交缓冲液重悬探针。

3.2.3 探针变性和杂交

1. 75℃变性探针 5min，然后在 37℃复性 0.5～1h 以充分封闭重复片段。

2. 将探针加到完成预复性的阵列上，盖上盖片并橡皮泥封片，在 37℃用杂交缓冲液湿润的湿盒中杂交 24h（见注释 3）。

3.2.4 洗脱

1. 阵列在 55℃ 50%甲酰胺/2×SSC，pH7.0 中洗 3 次，每次 10min，然后在含 0.1% NP-40，pH8 的 0.1mol/L 磷酸钠缓冲液中室温洗 5～10min。

2. 去掉多余的液体，加 DAPI/抗淬灭剂后盖上盖玻片。

4. 注释

1. 在建立标准化的术语方面存在争议。尽管“探针”指的是结合到微阵列上的已知的核酸序列，而“靶”指的是样本的未知序列[36]。为了保持一致，本章遵循目前所有微阵列 CGH 出版物采用的惯称。

2. 在自动化和实用的批量提取方法出现之前，许多实验室采用大量提取试剂盒提取靶 DNA 制备微阵列 CGH。这是一种费时费力的实验，靶 DNA 在多次的阵列点样后用完时，需要反复多次的提取 DNA。如果有足够的纯化靶 DNA (用大量或小量制备，至少应有几百个纳克模板 DNA)，DOP-PCR 可用来提供无限的靶 DNA。

3. 在整个杂交过程中，确保微阵列湿润是至关重要的。随时加入杂交缓冲液以确保杂交盒湿润，以免探针或封闭混合物蒸发。如果微阵列干了，结果将不可信。

4. 这里所列的是对在大约 $(18\times16)mm^2$ 范围内达到 3500 个样的 cDNA 微阵列的优化实验方案[9,10]。当采用较大点样区域内的较高密度的微阵列时，DNA 量和最后的杂交体积必须按比例提高。

5. 为得到高质量的微阵列 CGH 结果，未标记的基因组 DNA 片段大小和纯度是非常重要的。用于标记的 DNA 的纯度越低，得到的微阵列结果背景越高、杂交信号越弱。这里叙述的是从新鲜组织中提取基因组 DNA 进行微阵列 CGH 的最优实验方案。

6. 选择用限制性内切核酸酶进行消化对提高标记效率非常重要。值得注意的是，降低标记前 DNA 片段平均长度，将提高标记效率，而过度消化得到的探针片段太小而不能用于与 cDNA 靶杂交。在我们实验室中，使用 *Eco*R I 消化人类基因组 DNA 得到非常满意的稳定结果。

7. 在开始建立实验方法时，进行一系列的杂交和洗脱温度梯度实验，以得到最佳杂交强度和特异性。在我们实验室[10]，发现 37℃杂交和 55℃洗脱可非常灵敏地检测高拷贝获得和扩增，而洗脱温度提高到 65℃将降低微阵列的信号强度。过低的洗脱温度可能产生非特异结合（过多的黄色信号）。我们建议预实验中用来源不同的样本 DNA 进行不同的标记，以得到最佳的实验技术特异性。

8. 到目前为止，仍没有标准化的阵列制备方法。发表的论文中靶 DNA 浓度为 400～1000μg/mL 时，用人工点样在多聚赖氨酸处理的玻片上[11]，或 2μg/μL 靶 DNA 点样在氨丙基三甲氧硅烷处理过的玻片上[12]。请注意随着机器点样仪的自动化程序的出现，DNA 浓度和玻片处理方法都可能随之改变。

9. 这里提到的方法是假定在 $(22\times20)mm^2$ 玻璃盖片范围内构建最大量的小格化点样面积。另外，假定靶 DNA 在阵列制备的过程中已经变性[12]。否则，在

与探针杂交前，微阵列必须在70%甲酰胺/4×SSC中变性2min[11]。

10. 探针的最终长度依赖于DNA酶I的浓度。用于CGH实验的探针最佳长度在500～2000bp范围内。酶的储存液浓度为1×10^{-4} U/μL，实验前用DNA酶I稀释液新鲜配制成终浓度5×10^{-5} U/μL的使用液。然而，随着要求所获得的DNA理想片段长度的改变，酶浓度也相应的做出调整。

11. 将0.05～0.1倍体积的每种标记混合物进行DNA染色（如溴化乙锭）的凝胶电泳。由于可以有助于阵列CGH的问题解决，所以推荐采用琼脂糖凝胶电泳评估标记。

致谢

非常感谢 Paula Marrano、Bisera Vukovic、Monique Albert 和 Pascale Macgregor 为本论文提出宝贵意见。本研究得到加拿大国家癌症研究所的支持，得到 Canadian Cancer Society 的资助。PCP 得到 AFUD 和 Imclone System 公司的支持。

（陈　艳 译，刘青杰 校）

参考文献

1. Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. P., Sudar, D., et al. (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* **258,** 818–821.
2. Kallioniemi, O. P., Kallioniemi, A., Sudar, D., et al. (1993) Comparative genomic hybridization: a rapid new method for detecting and mapping DNA amplification in tumors. *Semin. Canc. Biol.* **4,** 41–46.
3. Forozan, F., Karhu, R., Kononen, J., Kallioniemi, A., and Kallioniemi, O. P. (1997) Genome screening by comparative genomic hybridization. *Trends Genet.* **13,** 405–409.
4. James, L. A. (1999) Comparative genomic hybridization as a tool in tumour cytogenetics. *J. Pathol.* **187,** 385–395.
5. Parente, F., Gaudray, P., Carle, G. F., and Turc-Carel, C. (1997) Experimental assessment of the detection limit of genomic amplification by comparative genomic hybridization CGH. *Cytogenet. Cell Genet.* **78,** 65–68.
6. Lennon, G., Auffray, C., Polymeropoulos, M., and Soares, M. B. (1996) The I. M. A. G. E. Consortium: an integrated molecular analysis of genomes and their expression. *Genomics* **33,** 151–152.
7. Schena, M., Shalon, D., Davis, R. W., and Brown, P. O. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270,** 467–470.
8. DeRisi, J., Penland, L., Brown, P. O., et al. (1996) Use of a cDNA microarray to analyse gene expression patterns in human cancer. *Nat. Genet.* **14,** 457–460.
9. Pollack, J. R., Perou, C. M., Alizadeh, A. A., et al. (1999) Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. *Nat. Genet.* **23,** 41–46.
10. Beheshti, B., Braude, I., Marrano, P., Thorner, P., Zielenska, M., and Squire, J. A. (2002) Survey of DNA amplifications in neuroblastoma tumors using cDNA microarrays. Submitted to *Neoplasia*.

11. Solinas-Toldo, S., Lampel, S., Stilgenbauer, S., et al. (1997) Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes Chr. Canc.* **20,** 399–407.
12. Pinkel, D., Segraves, R., Sudar, D., et al. (1998) High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat. Genet.* **20,** 207–211.
13. Heiskanen, M. A., Bittner, M. L., Chen, Y., et al. (2000) Detection of gene amplification by genomic hybridization to cDNA microarrays. *Canc. Res.* **60,** 799–802.
14. Raap, A. K., van de Corput, M. P., Vervenne, R. A., van Gijlswijk, R. P., Tanke, H. J., and Wiegant, J. (1995) Ultra-sensitive FISH using peroxidase-mediated deposition of biotin- or fluorochrome tyramides. *Hum. Mol. Genet.* **4,** 529–534.
15. Jones, T. A., Flomen, R. H., Senger, G., Nizetic, D., and Sheer, D. (2000) The homeobox gene MEIS1 is amplified in IMR-32 and highly expressed in other neuroblastoma cell lines. *Eur. J. Canc.* **36,** 2368–2374.
16. Spieker, N., van Sluis, P., Beitsma, M., et al. (2001) The MEIS1 oncogene is highly expressed in neuroblastoma and amplified in cell line IMR32. *Genomics* **71,** 214–221.
17. Pei, J., Beheshti, B., Squire, J. A., and Zielenska, M. (2002) cDNA array CGH analysis of pediatric osteosarcomas identifies regions of amplification on chromosome 17. In preparation.
18. Halgren, R. G., Fielden, M. R., Fong, C. J., and Zacharewski, T. R. (2001) Assessment of clone identity and sequence fidelity for 1189 IMAGE cDNA clones. *Nucl. Acids Res.* **29,** 582–588.
19. Albertson, D. G., Ylstra, B., Segraves, R., et al. (2000) Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. *Nat. Genet.* **25,** 144–146.
20. Bruder, C. E., Hirvela, C., Tapia-Paez, I., et al. (2001) High resolution deletion analysis of constitutional DNA from neurofibromatosis type 2 (NF2) patients using microarray-CGH. *Hum. Mol. Genet.* **10,** 271–282.
21. Daigo, Y., Chin, S. F., Gorringe, K. L., et al. (2001) Degenerate oligonucleotide primed-polymerase chain reaction-based array comparative genomic hybridization for extensive amplicon profiling of breast cancers: a new approach for the molecular analysis of paraffin-embedded cancer tissue. *Am. J. Pathol.* **158,** 1623–1631.
22. Weber, T., Weber, R. G., Kaulich, K., et al. (2000) Characteristic chromosomal imbalances in primary central nervous system lymphomas of the diffuse large B-cell type. *Brain Pathol.* **10,** 73–84.
23. Geschwind, D. H., Gregg, J., Boone, K., et al. (1998) Klinefelter's syndrome as a model of anomalous cerebral laterality: testing gene dosage in the X chromosome pseudoautosomal region using a DNA microarray. *Dev. Genet.* **23,** 215–229.
24. Hui, A. B., Lo, K. W., Yin, X. L., Poon, W. S., and Ng, H. K. (2001) Detection of multiple gene amplifications in glioblastoma multiforme using array-based comparative genomic hybridization. *Lab. Invest.* **81,** 717–723.
25. Cheung, V. G., Nowak, N., Jang, W., et al. (2001) Integration of cytogenetic landmarks into the draft sequence of the human genome. *Nature* **409,** 953–958.
26. Telenius, H., Carter, N. P., Bebb, C. E., Nordenskjold, M., Ponder, B. A., and Tunnacliffe, A. (1992) Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* **13,** 718–725.
27. Cheng, S., Fockler, C., Barnes, W. M., and Higuchi, R. (1994) Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91,** 5695–5699.

28. Lichter, P., Joos, S., Bentz, M., and Lampel, S. (2000) Comparative genomic hybridization: uses and limitations. *Semin. Hematol.* **37,** 348–357.
29. Wilgenbus, K. K. and Lichter, P. (1999) DNA chip technology ante portas. *J. Mol. Med.* **77,** 761–768.
30. King, W., Proffitt, J., Morrison, L., Piper, J., Lane, D., and Seelig, S. (2000) The role of fluorescence in situ hybridization technologies in molecular diagnostics and disease management. *Mol. Diagn.* **5,** 309–319.
31. Cheung, V. G., Morley, M., Aguilar, F., Massimi, A., Kucherlapati, R., and Childs, G. (1999) Making and reading microarrays. *Nat. Genet.* **21,** 15–19.
32. Eisen, M. B., Spellman, P. T., Brown, P. O., and Botstein, D. (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95,** 14,863–14,868.
33. Brazma, A. and Vilo, J. (2000) Gene expression data analysis. *FEBS Lett.* **480,** 17–24.
34. Kerr, M. K., Martin, M., and Churchill, G. A. (2000) Analysis of variance for gene expression microarray data. *J. Comput. Biol.* **7,** 819–837.
35. Sherlock, G., Hernandez-Boussard, T., Kasarskis, A., et al. (2001) The Stanford Microarray Database. *Nucl. Acids Res.* **29,** 152–155.
36. Phimister, B. (1999) Going Global (Editorial). *Nat. Genet.* **21,** 1.
37. Alon, U., Barkai, N., Notterman, D. A., et al. (1999) Broad patterns of gene expression revealed by clustering analysis of tumor and normal colon tissues probed by oligonucleotide arrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96,** 6745–6750.

第三部分　在染色体病中的应用



第 15 章　描述标记染色体的分子途径

Michael D. Graf, Stuart Schwartz

1. 引言

标记染色体是不能用常规细胞遗传学方法识别的结构异常的额外染色体。标记染色体的例子包括环形染色体、衍生染色体、双着丝粒染色体和微小染色体。当前资料指出额外标记染色体在新生儿中的发生率为 0.14‰～0.72‰，产前检测中更多，为 0.65‰～1.5‰[1]。标记染色体的意义由多种因素决定，包括遗传、发现模式、染色体来源、标记染色体的结构和形态。

2. 标记染色体的临床意义

大约 40％的标记染色体是家族性的。在这种情况下，遗传获得标记染色体的个体通常没有表型改变。但也有例外情况，诸如单亲二倍体（UPD），或者如果父母亲的标记染色体为未识别的、低水平的、组织特异性嵌合体但没有表型改变[1～4]。由于发现方式的原因，绝大多数出生后确定的标记染色体与表型异常有关。出生前发现的标记染色体更让人怀有疑问，因为只有很少一部分病例出现相关的异常。

已有大量单个病例报告或特殊标记染色体及相关表型的少数病例报告发表。然而，更有影响力的研究是对有关标记染色体的连续分析或大量单个病例进行数据收集。一些最近的有价值的研究采用分子细胞遗传学方法分析标记染色体，按染色体来源、形态和表型将其分组。第一项主要研究根据 377 000 例羊水诊断的标记染色体分析数据提供一般性风险概率[5]。研究数据指出产前确定的、新出现的额外标记染色体有 13％的可能发生相关表型异常。然而，该研究完成在 FISH 技术出现之前，所以描述标记染色体特征的能力有限。其后，几篇研究报告收集标记染色体病例，对标记染色体进行分子细胞遗传学分析，试图建立表型和核型的相互关系。

在 Warburton 的研究[5]之后，规模最大的对标记染色体的表型异常风险进行描述的研究是由 Crolla 在 1998 年完成的[6]。他采用 FISH 分析，并结合了当时所有的常染色体标记染色体病例（共 168 例）的相关数据。该研究排除了性染色体标记物和其他更常见的标记物，如源于 15 号染色体的、与猫眼综合征相关来自 22 号染色体的、染色体（9、12 和 18 号染色体）短臂等臂染色体，因为这

些标记染色体在临床上已经得到了详细描述（见本章 4.3 和 4.4）。除了提供来自特殊染色体标记物的相关信息以外，还得到一些一般性结论。如同预期的，比起遗传自正常表型父母的标记染色体，新出现的标记染色体更经常与表型异常有关。另外，该研究支持这一事实：标记染色体主要来源于近端着丝粒染色体。即使排除来自 15 号染色体的标记染色体后，其他近端着丝粒染色体来源的标记染色体仍占该研究中的大多数（60%）。另外，发现来自近端着丝粒染色体的标记染色体，比起其他染色体来源的、发生表型异常的可能性更低（分别为 7.1%和 28.6%）（不包括导致猫眼综合征的、源于 15 号染色体的和决定为 18p 等臂染色体的标记染色体）。

正在进行的一项合作研究将收集得到目前最大数量的标记染色体病例（超过 500 例）。该研究的初步数据表明：产前发现的新出现的标记染色体相关表型异常的风险率高于目前文献的结果[7]。

尽管关于标记染色体的确切表型/核型数据仍不完整，不过有必要描述每条标记染色体的特征，使潜在的临床相关性得到充分运用。在本章中我们有两个目的：首先，提供已知标记染色体表型/核型的相关信息；其次，阐述在尝试建立表型/核型相关关系过程中有效描述标记染色体特征的途径。

3. 可采用的技术

除了标准 FISH 分析，还有几种分子细胞遗传学技术能有效描述标记染色体的特征，其中包括光谱核型分析（SKY）、M-FISH、CGH 和显微切割后反向涂染技术。M-FISH 和 SKY 用不同颜色同时标记每条染色体，可以确定标记染色体的来源[8,9]。CGH 和显微切割也可以用于描述染色体片段的来源[10,11]。其中大多数技术在本书的其他部分有详细阐述，但并非所有实验室都能开展。

已证明有几种不同类型的 FISH 探针在描述标记染色体结构的时候非常有效，包括着丝粒特异性探针（α 卫星）、全染色体涂染探针、商品化染色体特异性探针、来自人类基因组计划的信息制备的 BAC（细菌人工染色体）探针。当确定一条特殊标记染色体后，FISH 技术结合依据其分析结果发现病例的收集，使得几种标记染色体与表型的关系建立。

4. 表型/核型相关关系

4.1 15 号双着丝粒染色体

该标记染色体由 15 号染色体的两条短臂和部分长臂构成，有时被称为 15 号倒位重复或 inv-dup[15]。可以用细胞遗传学技术描述该标记染色体有几种变异。

如果15号等臂双着丝粒染色体比较大，可能含有Prader-Willi/Angelman综合征的关键区域，将出现相关表型包括智力障碍、发育延迟、行为紊乱、抽搐、张力减退和斜视；如果标记染色体为PWS/AS关键区域的三体或四体，表型类似[12,13]；如果15号等臂双着丝粒染色体比较小，而且确定不含有PWS/AS区域，通常表型正常，除非发生单亲二倍体[14~16]。

4.2 22号双着丝粒染色体

该标记染色体由22号染色体的两条短臂和部分长臂构成，有时被称为22号倒位重复或inv-dup[22]。当22号双着丝粒染色体含有猫眼综合征的关键区域（22q11）时，个体通常具有多变的表型，包括虹膜和（或）视网膜缺损、耳前皮肤标记和凹陷、肛门闭锁、鳃裂、心脏缺陷、肾脏畸形、泌尿生殖缺陷、轻到中度智力障碍和异常面容[17~20]。

4.3 12p等臂染色体

该标记染色体通常在嵌合体中发现，与Pallister-Killian综合征有关。与羊水和皮肤相比，在淋巴细胞中较少发现该标记染色体。大多数Pallister-Killian综合征个体具有这种标记染色体，由12号染色体的两条短臂构成，因此是12号染色体短臂四倍体。表型包括严重智力障碍、抽搐、张力减退、色素异常、头发稀少和面部粗糙[21,22]。然而，表型可能极为不稳定，有报告证实一例轻度病例其较高比例的细胞中含有该标记染色体[23]。

4.4 18p等臂染色体

具有该标记染色体的个体为18号染色体短臂四倍体，经常具有一系列的特征，包括低出生体重、重度智力障碍、张力减退、身材矮小、抽搐、小头畸形和特征性面容[24,25]。

4.5 性染色体标记物

涉及X或Y染色体的标记物通常在45，X核型、45，X或45，Y与正常细胞系的嵌合体中发现。这些标记物不符合我们对标记染色体的准确定义，因为它们不是额外的。然而，这些结构异常的染色体仍然常被称为标记染色体。

首先应确定这些标记染色体是否来源于X或Y染色体。来自X染色体的标记染色体应对XIST的存在与否进行评估，因为研究结果表明XIST缺失经常与

智力障碍/发育延迟有关。然而，如果核型为嵌合体的话，表型结果也依赖于标记染色体中遗传物质的含量[26,27]。

来自Y染色体的标记染色体经常在具有Turner综合征特征的45，X嵌合体中出现。确定是否存在靠近Y染色体着丝粒的性腺胚细胞瘤区域（GBY）是很重要的，因为有文献提示存在该区域的表型女性可能存在患性腺胚细胞瘤的风险[28,29]。

5. 有效描述标记染色体标记物的途径

5.1 遗传

既然绝大多数的遗传获得的标记染色体没有相关的异常表型，那么首先确定标记染色体是家族性还是遗传性的是非常必要的。

5.2 常规细胞遗传学

用G显带分析通常可以提供标记染色体几方面有用的信息。G显带有时提示标记染色体的形态或结构，有助于确定应进行哪些附加检测。例如，如果通过G显带观察到形态卫星，实验者可以将附加检测集中在近端着丝粒染色体。另外，G显带可以指出标记染色体特定的染色体来源，如12p四体或18p等臂染色体。这种情况下，通常用FISH分析证实标记染色体的来源。最后，G显带可以发现嵌合体（如果存在的话）。如果发现标记染色体的发生概率很低，常会使附件的FISH分析更加困难，因为也许只有很少的中期分裂相含有标记染色体，或在培养过程中标记染色体发生丢失。

5.3 如果细胞遗传学研究不能提示染色体来源

5.3.1 着丝粒存在

首先用着丝粒探针（α卫星探针）确定标记染色体中是否含有着丝粒。随着描述技术的不同，可以采用合适的治疗类选法。另外，如果标记染色体中无着丝粒，那么标记物中含有常染色质成分的可能性增大，因此相关表型异常的风险随之提高。

5.3.2 无着丝粒标记染色体或大的标记染色体

对那些无着丝粒或除着丝粒外还存在常染色质成分的标记染色体，采用

SKY、M-FISH、CGH 或染色体显微切割技术（如果可能的话）来确定标记染色体的来源。

5.3.3 有着丝粒或小的标记染色体

如果标记染色体很小且含有大部分着丝粒成分，或只存在少部分细胞中，上述的技术将无用武之地。只要标记染色体中存在着丝粒成分，采用一套探针如英国 Cytocell 公司的 Chromoprobe Multiprobe System，即用一套所有染色体的 α 卫星探针确定着丝粒成分的存在。然而，这种方法最适于外周血样品，而不是产前样品或其他培养细胞。如果无法开展上述的任何技术，可以使用针对所有染色体的染色体特异性 α 卫星探针。然而，使用通常与标记染色体有关的染色体（如 13、14、15、18、21、22、X 和 Y 染色体）的探针开始进行这种分析。如果仍未确定标记染色体的来源，也可以用其他染色体的特异性探针来分析。

5.3.4 已知标记物的染色体来源

一旦已知标记染色体的染色体来源，用商品化染色体特异性探针或 BAC 来进一步确定标记染色体的意义比较有益。例如，如果确定标记物来自 15 号染色体，使用 PWS/AS 关键区域范围内的探针（SNRPN、D15S11 或 GABRB3)。如果标记物含有 PWS/AS 关键区域，很可能出现相关的异常表型。

6. 特殊病例

6.1 绒毛膜样品（CVS）

进行细胞遗传学分析的绒毛膜样品中 1％～2％为嵌合体[30]。其中一些病例可能含有标记染色体，无论嵌合现象确定为限制性胎盘嵌合现象或真正胎儿嵌合现象，通常都应进行附加实验来证实。限制性胎盘嵌合现象与宫内发育延迟有关，依据涉及染色体的不同，如果发生 UPD，胎儿会出现异常表型[31]。当 CVS 显示嵌合现象，一般建议进行羊膜穿刺，因为通常无法确定异常细胞系来源于胎儿还是胎盘。如果之后的羊膜穿刺分析为正常核型或者嵌合体核型，如果标记物来自具有重要印迹效应的染色体（6、7、11、14 和 15 号染色体)，应考虑进行 UPD 研究[32]。

6.2 羊膜穿刺

羊膜穿刺标本中的嵌合现象很可能是真正的嵌合体，不推荐反复羊膜穿刺。如果涉及标记染色体，因为预后可能不同，试图确定它的染色体来源是至关重要

的。然而，确定标记染色体的染色体来源后，如果标记物来自具有重要印迹效应的染色体（6、7、11、14 和 15 号染色体），应考虑进行 UPD[32]。

6.3 嵌合体（一般性）

一部分标记染色体，尤其是出生前确定的标记染色体被发现为嵌合体。当只有少部分的细胞含有标记染色体时，因为培养过程中标记染色体会随时间而丢失，所以无法进行更深入的研究。对于出生前确定标记染色体的病例，建议取得出生后样本［脐带血、胎盘和（或）包皮］以确定是否在其他组织中存在标记染色体。其他组织样本（外周血除外）同样可以为出生后确定的标记染色体病例提供更多信息。尽管这些分析的结果不能改变预后，但有助于更好地描述标记染色体的意义。

6.4 资源匮乏

对一些病例，实验者需要进行大量检测来试图描述标记染色体的特征。每种检测都费力且高费用。然而，任何附加分析得到的任何新增信息对内科医生和家人确定标记染色体的意义都有极大帮助。这些信息甚至对出生前确定的病例也有帮助。如果一个实验室无法描述标记染色体特征，或者他们缺少开展附加实验的资源条件，应鼓励他们联系其他实验室以确定能否提供帮助。甚至在经过令人疲惫的寻找后，可能由于嵌合现象发生率低或标记物太小，或只含有着丝粒成分，而对少数具有标记染色体的病例无法描述其特征，所以我们鼓励实验室保存先证者的遗传物质，如果可能的话，还应包括其父母的遗传物质，一旦获得新的资源或技术就可以启动进一步的研究。

（陈　艳 译，刘青杰 校）

参考文献

1. Blennow, E., Bui, T., Kristofferson, U., et al. (1994) Swedish survey on extra structurally abnormal chromosomes in 39,105 consecutive prenatal diagnoses: Prevalence and characterization by fluorescence *in situ* hybridization. *Prenat. Diagn* **14,** 1019–1028.
2. Steinbach, P., Djalali, M., Hansmann, I., et al. (1983) The genetic significance of bisatellited marker chromosomes. *Hum. Genet.* **65,** 155–164.
3. Sachs, E. S., Van Hemel, J. O., Den Hollander, J. C., and Jahoda, M. G. (1987) Marker chromosomes in a series of **10,**000 prenatal diagnoses: Cytogenetic and follow-up studies. *Prenat. Diagn.* **7,** 81–89.
4. Carrusco, J. J. L., Otewro, G. A., Vilar, M. M. C., et al. (1990) Small marker chromosomes in a series of 1000 prenatal diagnoses by amniocentesis. *Ann. Genet.* **33,** 40–42.

5. Warburton, D. (1991) *De novo* balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *Am. J. Hum. Genet.* **49,** 995–1013.
6. Crolla, J. (1998) FISH and molecular studies of autosomal supernumerary marker chromosomes excluding those derived from chromosome 15: II. Review of the literature. *Am. J. Med. Genet.* **75,** 367–381.
7. Graf, M. D., Mowrey, P. N., Van Dyke, D. L., Pettenati, M. J., Eichler, E. E., and Schwartz, S. (2000) Molecular and cytogenetic delineation of marker chromosomes: Implications for phenotypic effects. (Abstract no. 260) *Am. J. Hum. Gen.* **67,** 60.
8. Haddad, B. R., Schrock, E., Meck, J., et al. (1998) Identification of de novo chromosomal markers and derivatives by spectral karyotyping. *Hum. Genet.* **103,** 619–625.
9. Jalal, S. M., Law, M. E., Lindor, N. M., Thompson, K. J., and Sekhon, G. S. (2001) Application of multicolor fluorescence *in situ* hybridization for enhanced characterization of chromosomal abnormalities in congenital disorders. *Mayo. Clin. Proc.* **76,** 16–21.
10. Levy, B., Dunn, T. M., Kaffe, S., Kardon, N., and Hirschhorn, K. (1998) Clinical applications of comparative genomic hybridization. *Genet. Med.* **1,** 4–12.
11. Anderlid, B. M., Sahlen, S., Schoumans, J., et al. (2001) Detailed characterization of 12 supernumerary ring chromosomes using micro-FISH and search for uniparental disomy. *Am. J. Hum. Genet.* **99,** 223–33.
12. Crolla, J. A., Harvey, J. F, Sitch, F. L., and Dennis, N. R. (1995) Supernumerary marker 15 chromosomes: a clinical, molecular, and FISH approach to diagnosis and prognosis. *Hum. Genet.* **95,** 161–170.
13. Webb, T., Hardy, C. A., King, M., Watkiss, E., Mitchell, C., and Cole T. (1998) A clinical, cytogenetic, and molecular study of 10 probands with supernumerary inv dup (15) marker chromosomes. *Clin. Genet.* **53,** 34–43.
14. Robinson, W. P., Spiegel, R., and Schinzel, A. A. (1993) Deletion breakpoints associated with the Prader-Willi and Angelman syndromes (15q11–q13) are not sites of high homologous recombination. *Hum. Genet.* **91,** 181–184.
15. Cheng, S. D., Spinner, N. B., Zackai, E. H., and Knoll, J. H. (1994) Cytogenetic and molecular characterization of inverted duplicated chromosomes 15 from 11 patients. *Am. J. Hum. Genet.* **55,** 753–759.
16. Leana-Cox, J., Jenkins, L., Palmer, C. G., et al. (1994) Molecular cytogenetic analysis of inv dup(15) chromosomes using probes specific for the Prader-Willi/Angelman syndrome region: Clinical Implications. *Am. J. Hum. Genet.* **54,** 748–756.
17. Schinzel, A., Schmid, W., Fraccaro, M., et al. (1981) The "cat eye syndrome": Dicentric small marker chromosome probably derived from a no.22 (tetrasomy 22pter to q11) associated with a characteristic phenotype. Report of 11 patients and delineation of the clinical picture. *Hum. Genet.* **57,** 148–158.
18. McDermid, H. E., Duncan, A. M. V., Brasch, K. R., et al. (1986) Characterization of the supernumerary chromosome in cat eye syndrome. *Science.* **232,** 646–648.
19. Mears, A. J., Duncan, A. M., Budarf, M. L., et al. (1994) Molecular characterization of the marker chromosome associated with cat eye syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **55,** 134–142.
20. Crolla, J. A., Howard, P., Mitchell, C., Long, F. L., and Dennis, N. R. (1997) A molecular and FISH approach to determining karyotype and phenotype correlations in six patients with supernumerary marker(22) chromosomes. *Am. J. Med. Genet.* **72,** 440–447.
21. Reynolds, J. F., Daniel, A., Kelly, T. E., et al. (1987) Isochromosome 12p mosaicism (Pallister mosaic aneuploidy or Pallister-Killian syndrome): Report of 11 cases. *Am. J. Med. Genet.* **27,** 157–174.

22. Schinzel, A. (1991) Tetrasomy 12p (Pallister-Killian syndrome). *J. Med. Genet.* **28,** 122–125.
23. Bielanska, M. M., Khalifa, M. M., and Duncan, A. M. V. (1996) Pallister-Killian syndrome: A Mild case diagnosed by Fluorescence *in situ* hybridization. Review of the literature and expansion of the phenotype. *Am. J. Med. Genet.* **65,** 104–108.
24. Callen, D. F., Freemantle, C. J., Ringenbergs, M. L., et al. (1990) The isochromosome 18p syndrome: confirmation of cytogenetic diagnosis in nine cases by *in situ* hybridization. *Am. J. Hum. Genet.* **47,** 493–498.
25. Darnaude, M. T., Diaz de Bustamante, A., Cabello, P., and Vallcorba, I. (1996) Genetic counselling in a prenatal marker chromosome identified as an i(18p) by *in situ* hybridization. *Ann. Genet.* **39,** 61–63.
26. Schwartz, S., Depinet, T. W., Leana-Cox, J., et al. (1997) Sex chromosome markers: characterization using fluorescence *in situ* hybridization and review of the literature. *Am. J. Med. Genet.* **71,** 1–7.
27. Wolff, D. J., Brown, C. J., Schwartz, S., Duncan, A., Surti, U., and Willard, H. (1994) Small marker X chromosomes lack the X inactivation center: implications for karyotype/phenotype correlations. *Am. J. Hum. Genet.* **55,** 87–95.
28. Patsalis, P. C., Hadjimarcou, M. I., Velissariou, V., et al. (1997) Supernumerary marker chromosomes (SMCs) in Turner syndrome are mostly derived from the Y chromosome. *Clin Genet.* **51,** 184–190.
29. Gravholt, C. H., Fedder, J., Naeraa, R. W., and Muller, J. (2000) Occurrence of gonadoblastoma in females with Turner syndrome and Y chromosome material: a population study. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **85,** 3199–3202.
30. Fryburg, J. S., Dimaio, M.S, Yang-Feng, T. L., and Mahoney, M. J. (1993) Follow-up of prengancies complicated by placental mosaicism diagnosed by chorionic villus sampling. *Prenat. Diagn.* **13,** 481–494.
31. Farra, C., Giudicelli, B., Pellissier, M. C., Philip, N., and Piquet, C. (2000) Fetoplacental chromosomal discrepancy. *Prenat. Diagn.* **20,** 190–193.
32. Kotzot, D. (1999) Abnormal phenotypes is uniparental disomy (UPD): Fundamental aspects and a critical review with bibliography of UPD other than 15. *Am. J. Med. Genet.* **82,** 265–274.

第16章 运用间期核荧光原位杂交对常见非整倍体的产前诊断

Baruch Feldman, Ayala Aviram-Goldring, Mark I. Evans

1. 引言

1.1 用于产前诊断的间期核FISH分析

细胞遗传学分析是目前产前诊断的标准方法，用于怀有染色体异常胎儿高风险孕妇的常规检查。染色体异常产前诊断的传统“金标准”是中期染色体的G显带分析。标准细胞遗传学方法的最大优点在于不仅可以高准确率（>99.5%）地检测染色体结构异常，还能准确地检测非整倍体。然而，传统的染色体核型分析需要一段时间从培养的胚胎细胞中制备中期染色体。尽管在过去的30年里，报告结果所需的时间已显著缩短，但仍然需要7～12天，其中主要是培养细胞的时间[1]。

在特定临床情况下，特别是产前诊断，等待核型分析结果给患者造成巨大的心理压力，同时给主诊医生造成负担[2～6]。染色体分析作为常规的产前诊断方法已经被全世界接受，核型分析技术的进步仅仅增加了人们对立即得到结果的需求，况且临床医生和患者更无法忍受报告结果的延迟[7,8]。正因为这个原因，许多产科医生和细胞遗传学家怀着极大的期望和热情接受间期核FISH技术用于常见的染色体非整倍体分析。他们认为快捷的FISH分析能减少等待结果的焦虑，且便于及早做出决定[7,8]。

荧光原位杂交（FISH）包括荧光素标记的特异性探针与患者染色体DNA杂交，并用荧光显微镜检测信号。FISH不仅能用于中期染色体，也可用于间期核的诊断，因此不需要培养细胞进行诊断。FISH作为一种在临床细胞遗传学中很有潜力的诊断技术，在大约15年前问世[9,10]。已经证实：用特异性探针FISH检测间期核的染色体数目非常快捷有效[11～17]。

仅5种染色体（13、18、21、X、Y）的非整倍体约占所有染色体异常的65%，占染色体畸变导致出生缺陷的85%～95%[18～20]。因此，对这5种染色体进行快速计数在产前诊断中具有重要价值。在20世纪90年代早期，就设计出一种在未培养的胎儿细胞中发现最常见染色体异常的快速产前检查方法[21～23]。自

此，用 FISH 对 13、18、21 号常染色体三体和性染色体异常进行产前筛查逐渐在世界范围内推广。

1.2 历史背景和认识

早期研究已发现用 FISH 能识别未培养的间期细胞核中的特定染色体[9,11～17,34～36]。20 世纪 90 年代初期建立了可对最常见非整倍体进行快速常规产前诊断的 FISH 技术[21～23,37,36]。然而，对未培养的羊水细胞进行非整倍体检测的早期尝试工作，受到探针设计、样品制备及分析条件的限制。Klinger 等[37]和 Ward 等[38]相继报道了比较 FISH 方法和标准的细胞遗传学分析方法对非整倍体筛查的结果。他们的研究为在产前诊断中应用 FISH 技术奠定了临床操作程序的基础。然而，这两个及随后的早期研究仍然有一些缺陷，延迟了 FISH 作为一种可靠的产前诊断方法的广泛应用。许多研究最多是人为的“盲法分析”，并未对实际的临床应用进行评估。大批早期用 FISH 进行诊断研究失败的主要原因在于杂交失败，或是用于分析一条或多条染色体的细胞核数目不够从而得到有疑问的结果。另外值得注意的是在众多 FISH 实验研究中，确实有过假阳性和假阴性的报道。

考虑到 FISH 实验的灵敏度和特异性及其应用前景，尤其是缺乏统一的实验方法和诊断标准，FISH 在遗传学界遭到广泛的置疑[39]。1993 年，美国医学遗传学学院（ACMG）发表声明：应用于临床细胞遗传学的 FISH 技术应属于研究性质[40]，但他们同时声明，在成为标准的实验室技术之前，FISH 应用于间期核产前诊断必须结合标准的细胞遗传学分析，单凭 FISH 结果不能进行不可挽回的治疗行动。

在 ACMG 最初的政策声明中已经认识到 FISH 分析必须建立试剂的质量保证和质量控制措施，以及标准的实验操作程序[40]。声明同时倡议设计多中心参的更好的方案，进行前瞻性临床实验以评估 FISH 技术的分析性能及其在产前的临床应用的可行性。

建立标准实验方法及推广应用的主要障碍之一是用于间期核 FISH 的染色体特异性探针。研究报告的作者们[37,38,41～50]用各自实验室制备的不同探针，或是不同公司的商品化探针，而大多数实验室无合成 DNA 探针的资质，或并未对所用的每个探针进行必要的质控检测。另外，由于探针的质量和特性是 FISH 分析成功的关键因素，反应条件应根据探针批次的不同而进行修正。高特异性和非常可靠的多色商品化探针的出现，显著改进了 FISH 检测的效能，越来越多的应用到临床检测中。

1997 年，AneuVysion™ 试剂盒（美国 Vysis 公司）获得美国食品药品监督局（FDA）的认可，用于羊水细胞的 13、18、21、X 和 Y 染色体的计数。这个

试剂盒包括两套多色探针组合，一套是 18、X 和 Y 染色体的着丝粒 α 卫星探针的混合物，另一套是 13 和 21 号染色体的特异序列探针的混合物。自从通过美国 FDA 的审查和认证后，全世界许多实验室开始应用该试剂盒，从那时起将近 30 000例检测报告验证它的准确性及可靠性[51]（见注释 1）。

2000 年，ACMG 针对 FISH 技术应用在临床细胞遗传学分析发布了新的政策声明[52]。他们认为研究结果明确表明：间期核 FISH 技术对产前诊断和筛查染色体异常有高敏感性和准确性，可提供非常准确的结果。他们进一步得出：阳性 FISH 结果具有诊断参考价值。胎儿临床管理的最终决定需依据以下三个条件中的任意两条：阳性 FISH 结果、确定的染色体分析结果或一致的临床信息[52]。

目前，间期核 FISH 用于产前诊断仅限于未培养羊水细胞。正如其他人一样，我们相信 FISH 也可以用于未培养绒毛膜细胞（CVS）的分析[7, 32, 43~45, 53~59]，准确度与羊水细胞相当。遗憾的是，迄今关于 CVS 的 FISH 报道非常少，远不足以推断其在分析和临床应用的可靠性。

1.3 分析效能

ACMG 在最近的声明中指出 FISH 技术是分析准确度较高的检测系统[52]，实验程序可标准化、可控制。声明中明确认识到 7 年前的很多分析方面的疑问都得到了圆满的解答。Tepperberg 等[51]最近对文献进行广泛总结，得出用间期核 FISH 进行最常见染色体非整倍体产前诊断的整体分析效能。如果将所有文献报道的病例进行统计（47 312 个样本）[7,26~29,31,33,37,38,41~43,45~51,53,59~69]，FISH 实验的灵敏度为 99.39%，特异性为 99.98%，阳性预测值为 99.81%，阴性预测值为 99.94%。如果仅统计最近用 FDA 批准的探针进行研究发表的文章（29 039 例）[7,27~29,31,33,51,53,59,62~69]，分析效能更好，灵敏度达 99.75%，特异性达 99.99%，阳性预测值为 99.96%，阴性预测值为 99.97%。

1.4 临床应用

间期核 FISH 对常见 13、18、21、X 和 Y 非整倍体进行产前筛查是非常准确和可靠的检测。然而，要求实验者充分了解特异性实验能做些什么，更重要的是不能做什么。该检测具有极高的分析灵敏度、特异性及预测值。然而，真正与胎儿的临床管理相关的是 FISH 技术的临床分析的灵敏度和预测值，这与纯实验是完全不同的。

理论上，常规间期核 FISH 技术不能检测到除 13、18、21、X 和 Y 以外的其他染色体的非整倍体、染色体结构异常、环状染色体、标记染色体和多种嵌合

现象等染色体异常。然而，目前实验室要求该技术能检测所有用“金标准”——常规染色体核型分析能观察到的染色体异常。如参照这个临床相关定义，即使在100%准确度的试验中，常规 FISH 技术仍可能漏掉 25%～30%的能发现的细胞遗传学异常[8, 25, 70]。

FISH 技术和传统的细胞遗传学分析相比，影响其临床灵敏度的因素之一在于染色体分析的适应证[7]。由于染色体非整倍体是最主要的风险，且随着孕妇年龄增长而增高，预计 FISH 检测在筛查的孕妇中最大年龄个体中灵敏度最高。综合分析几大系列产前诊断的病例资料发现：用 13、18、21、X 和 Y 探针进行 FISH 试验能发现染色体异常的可能性已经确定[8, 25, 70]。在所有进行产前诊断的病例中，FISH 能发现约 70%的具临床意义的细胞遗传学异常。在高龄孕妇当中，临床灵敏度能达到 80%；而在异常超声或三标记物产前筛查发现的病例中，包括比较年轻的孕妇，其灵敏度降低。就此而论，灵敏度被定义为与新生儿疾病相关异常的检出率。

1.5 间期核 FISH——传统核型分析的辅助实验还是替代实验?

关于这个问题的详细经济学和社会学分析不在本节讨论的范围内。然而重要的是，目前主要的临床观点赞成用常规间期核 FISH 作为标准细胞遗传学分析的辅助分析手段，而不能作为替代方法。绝大多数的研究者都持这一观点[58, 70]。

用于检测常见染色体非整倍体的间期核 FISH 可能“漏掉”标准细胞遗传学分析发现的染色体异常的 30%。有争议认为相当数量的“漏掉”病例是没有临床意义的，其中很多病例的平衡易位、标记染色体就是很好的例子。然而，有些新出现的平衡易位和标记染色体大多与具临床意义的染色体异常有关，鉴别所有染色体重组对正确的遗传咨询及未来妊娠计划都很重要。

对 FISH 结果“阳性”的病例进行细胞遗传学确认同样重要。经典的核型分析将揭示非整倍体的发生机制（易位或三体），这对未来妊娠的再发风险估计很有必要。

有人会认为从费用收益出发，也许应该直接舍弃昂贵的细胞遗传学分析而进行快捷、相对便宜的 FISH 技术。然而，更多人认为，“漏诊”后付出的代价远比节省的成本要多[70]。

FISH 是一项发展中的令人振奋的技术。随着 FISH 技术的不断改进和不断涌现的相关新技术，在不久的将来会改变现在的等式平衡。

1.6 适应证

1.6.1 低风险妊娠

从理论上讲，所有要接受侵害性产前诊断进行细胞遗传学分析的孕妇都可受益于产前间期核 FISH 分析快速信息。但该实验最主要的适应证是高龄孕妇和经过多项血清指标筛查有唐氏综合征高风险的孕妇。尽管高龄和血清生化指标筛查异常的孕妇染色体数目异常的风险增高，但这类人群中真正确诊为染色体数目异常的比例相当低（3%～4%[7]）。其他相对低风险的适合侵入性产前诊断的情况，如母亲要求、胎儿宫内感染分析及单基因遗传病等显然不是 FISH 的适应证。

我们通常不为孕龄小于 20 周已经过常规产前诊断没有并发症的孕妇做附加的产前间期核 FISH 分析。另一方面，如果患者或她的咨询医生特别要求做，或者患者表现出异常焦虑，遗传咨询医生会考虑选择做能尽快出结果的 FISH 诊断。

1.6.2 超声结果异常

超声检查发现胎儿异常是染色体异常的最有意义的高危因素，特别是非整倍体[7, 28, 51, 59, 60]。依据特定的超声发现不同，经 G 显带核型分析确诊为染色体非整倍体的比率为 10%～20%。超声结果异常也是造成孕妇及其家人精神压力的主要原因。高比率的染色体数目异常和孕妇极度焦虑，加上超声结果异常，这是在许多情况下快速间期核 FISH 的常见适应证。在这些情况下，不论孕龄多大，往往会考虑快捷的检测。

1.6.3 孕晚期

几种受时间限制的产前状况下产前间期核 FISH 检测比其他时期产前诊断的受益更大；这时候，提早得到结果对临床医生能尽早做出决定非常关键。一种相当常见的状况是接近决定是否终止妊娠的最后期限。另一种状况是在孕 30 周或更晚时发现异常超声征象[28]。最后一种状况下，快速的间期核 FISH 产前诊断结果至少为判断多种异常胎儿的分娩方式提供有限的信息。

1.6.4 验证

拿到染色体结果异常的夫妇可能会心存疑问，是否结果判断错误或是同别的样本混淆。在做出是否终止妊娠的决定前，他们往往要求再次做染色体分析来证实。只要间期核 FISH 产前分析能够探测到最初的染色体异常，FISH 分析是一个快速确认结果而又不需再等待 7～14 天的极其有用的方法。然而，进行原代培养也是很重要的，以防 FISH 结果同最初的染色体分析结果不一致。

如果对培养细胞的分析结果为嵌合体的病例，要求实验室进行间期核 FISH 进行验证。在这种情况下，正常细胞和异常细胞的比例或胎儿及胚外膜中正常细胞和异常细胞的分布是胎儿异常程度的重要决定因素。与传统的细胞遗传学分析相比，间期核 FISH 因为有更多可供分析的细胞，并在更短的时间内完成计数，而有更高的统计学准确率[71]。

所有需验证的病例，因间期核 FISH 之前已经过标准的染色体分析，不必重复进行中期分裂相核型分析。

1.6.5 诊断性间期核 FISH 分析的适应证

通过一些超声检查发现的胎儿异常可能确诊为综合征。已知亲代为相关染色体重排的携带者也预示着胎儿存在非整倍体的高风险。有这些情况的孕妇都可能得益于产前间期核 FISH 分析和进行诊断性 FISH 检测[52]。

1.7 缺陷和不足

1.7.1 技术的内在局限

间期核 FISH 只是提供有关所用特异性探针序列位点的信息。已有的用于筛查最常见非整倍体的探针位点在 13、18、21、X 和 Y 染色体上，只能计数位点的拷贝数不能检测到重排。

目前用的 FISH 分析不能发现染色体结构异常以及 13、18、21、X 和 Y 以外的染色体数目异常，所以它还不能完全替代标准的细胞遗传学分析。在所有的检测报告中应强调和声明该技术的内在不足（见注释 2）。

1.7.2 技术假象

技术上的假象可能导致结果的错误判断，最常见的是信号重叠或信号分离。信号重叠往往是染色体重叠所致。信号分离可能是探针本身的原因或是姐妹染色单体分离造成。变性或杂交条件不理想、洗脱条件不合适都可能造成背景过高或信号太弱。

参照 ACMG 临床遗传学实验室标准和指南建立有效的质控体系、完善的技术员培训流程、建立报告参考数据库的验证系统能显著降低由技术假象导致结果的错误判断[72]（见注释 3 和 4）。

1.7.3 报告结果的延迟

间期核 FISH 产前诊断的显著优势是诊断速度和快速报告。许多实验室收到标本 24h 内就能报告结果，某些情况甚至只需 6h。但是，报告结果的延迟也可

能发生。发生报告延迟大多是因为遇到技术困难和标本需要重新进行杂交。例如，可检测信号的细胞数不够等技术困难，结果最多要延迟 24h。无论何种情况超过 48h 后仍无 FISH 结果，实验室负责人要考虑报告该样本 FISH 实验未能提供结果，因为在 5～10 天内将得到标准染色体分析的结果。

1.7.4 母源细胞污染

微绒毛取样（CVS）和羊膜穿刺术都是专为产前遗传检测获取胎儿细胞的方法。因此，任何产前遗传学检测结果解释的最大挑战之一是母源细胞的污染。

文献确实报道小量羊水培养的细胞中会有母源细胞的存在[73]，但很少导致误诊。然而，研究发现在培养和未培养的羊水细胞中母源细胞的比例明显不同[74]。培养的羊水标本中母源细胞污染（MCC）的比例估计约 0.4%[73]，已报道的数据显示在未培养的羊水标本中 MCC 的比例是 10%～20%[74～76]。这一数据表明当用未培养的胎儿细胞直接进行遗传学诊断时（如直接的 DNA 检测和快速间期核 FISH 分析）必须格外谨慎。

羊水或细胞团块中有可见血性与 MCC 的频率和程度紧密相关[74，75]。所以为避免因 MCC 导致结果判断失误最好的办法是只接受清亮、黄色的羊水样本做间期核 FISH。血性或褐色液体或细胞团块中已被大量红细胞污染的样本不适合做间期核 FISH，应做标准的细胞遗传学分析。

有学者提出产科技术的改进能明显减少 MCC 的发生[77～79]。用较小口径的穿刺针、尽可能避开胎盘、更重要的是弃去最先抽出的 5mL 羊水，能显著减少 MCC 的发生。许多有经验的产科医生能将血性样本的比例降至 1%～3%。

尽管许多 MCC 是由于羊水被母血污染所致，但最近有报道指出大约 10%的用于产前 FISH 诊断的显著羊水过少的样本，其中绝大多数有 MCC[80]。这些样本在 FISH 结果解释时必须谨慎。

微绒毛取样的 MCC 可能是血细胞，但更多的是蜕膜细胞。为尽量减少 CVS 的 MCC 风险，穿刺得到的样本必须由熟练的技术员在显微镜下一丝不苟地清洗，只有非常干净的绒毛才可以用来做 FISH。

通过上述措施，MCC 的风险明显降低但并未完全消除。Feldman 等报道了 301 例高危妊娠的前瞻性研究结果[59]。由具有熟练的产前遗传诊断技术的产科医生进行了非常严谨的操作，弃掉开始抽出的 5mL 羊水后的样本做 FISH，并排除肉眼可见的血性羊水或细胞团块样品。在上述的条件下，301 份样品中仍然有 5 份（1.7%）怀疑发生 MCC 而需要进一步的研究证实[59]。出现下列情况应考虑可能有 MCC：①样本同时有 XX 和 XY 信号；②同一玻片上的细胞形态不一；③间期核 FISH 结果怀疑有染色体嵌合现象。

1.7.5 形成嵌合现象的其他原因

其他出现嵌合型的情况有：限制性胎盘嵌合现象、真性胎儿嵌合、消失双胞胎综合征或技术失误等。由于是用未培养细胞进行实验，一般不考虑假性嵌合。

通过间期核 FISH 产前诊断很难发现嵌合现象。当 10%～85%的细胞显示一种核型或非整倍体，我们怀疑有嵌合现象。出现这些情况我们建议用 FISH 分析尽可能多的细胞，至少 100 个。同样还需要做分析大细胞量的标准细胞遗传学分析。

关于报告 FISH 实验怀疑的嵌合现象以及声称该实验无法提供信息仍存在公开的争论。我们相信极少数病例怀疑发生嵌合现象，如果 FISH 适应证不考虑时间限制，明智的做法是报告非确定性的结论，并等待标准的核型分析结果来确诊。

1.7.6 未提供任何信息的检测

FISH 检测未提供信息的发生概率很低，为 3%～5%。造成未提供任何信息的最常见的原因有：羊水或绒毛细胞量不够、发现肉眼可见的血性羊水或细胞团块。到目前为止，出现杂交失败和结果难以断定的情况很少。

FISH 检测通常需要 10mL 羊水，但若只得到 2～5mL 羊水，我们也尽量进行实验。

1.7.7 假阳性和假阴性结果

最近，Tepperberg 等公布了多中心的研究结果[51]。他们广泛总结了文献中的假性结果，同时提供了进行检测的综合分析数据。在 47 312 份资料(包括人群资料及公布的研究结果）中发现 9 例（0.019%）[7, 26～29, 31, 33, 37, 38, 41～43, 45～51, 53, 59～69]。其中 3 例错判 13/21 附加信号[45～47]，另外，6 例为性染色体（X 或 Y 染色体）信号的增加或缺失[38, 43, 48, 51, 64]。除此之外，几乎没有其他假阳性的报道，但这些都作为个案报道，并未包括在频率计算范围内[81～87]。

间期核 FISH 0.019%的假阳性率，风险很低。然而产前诊断涉及假阳性将会导致终止正常的妊娠，所以不能容许这种情况出现。正由于此原因，ACMG 在 1993 年最初的声明中提出不能仅凭 FISH 结果做不可挽回的治疗行为[40]。基于 FISH 的高精确性和可靠性，ACMG 最近改变了政策，声明做最终的临床决定必须具备以下 3 条中的任意两条：FISH 结果阳性、确定的染色体分析结果或一致的临床征象[52]。

Tepperberg 等统计的 FISH 的假阴性率也很低[51]。在 47 312 例人群资料调查中，报道了 23 例假阴性（占 0.049%）。其中包括 12 例为 21 三

体[34, 42, 46, 50, 66]、5例为13三体[38, 50, 51, 66]、4例为18三体[29, 38, 51, 66]、1例为X单体[42]，1例为被间期核FISH分析漏掉的诊断不明病例[68]。除此之外，几乎没有其他假阴性的报道，但这些都作为个案报道，并未包括在频率计算范围内[65, 86, 88, 89]。

假阴性在某种程度而言比假阳性的危害低，因为假阴性不会导致终止正常的妊娠。7～10天后的标准染色体分析将会发现假阴性结果，间期核FISH可得到很有效的支持。但是，FISH假阴性结果在某些情况下也会影响临床决定，特别是快速FISH的适应证在特定的时间段，做出假阴性诊断导致未能及时终止异常胎儿的妊娠，同样造成无法挽回的局面。同时需要强调的是技术自身的局限造成的临床假阴性率为2%～3%，间期核FISH不可能检测由于该技术本身不能发现的异常。

Tepperberg等建议用通过FDA认证的探针（AneuVysion™试剂盒）比用其他未通过FDA认证的探针，能减少假阳性和假阴性的发生率。据统计，用通过FDA认证的探针和未通过FDA审查的探针，假阳性率分别为0.003%和0.004%，假阴性率分别为0.024%和0.049%。但所有用通过FDA认证的Vysis探针的报道都是最近的[7, 27～29, 31, 33, 51, 53, 59, 62～69]，而用其他探针的报道都是以前的[26, 37, 38, 41～43, 45～50, 60, 61]。最近几年，除探针以外其他的改进，包括更多有经验的技术人员和临床工作者、可靠的实验方案、可用的参考文献范围和数据库的增加都是获得比较好的分析效能的原因。

人们广泛研究了引起错误结果的原因。发现大多误诊原因都可能避免，如母源性污染、探针的非特异杂交或杂交失败。但也有一部分误诊是无法避免的，如遗传多态性或染色体结构异常[51, 64, 81,5～89]。

2. 材料

2.1 实验仪器

1. 荧光显微镜和推荐的滤光片（见注释5）。
2. 相差光学显微镜。
3. 冰箱（1～4℃和－20℃）。
4. 离心机。
5. 微型离心机。
6. 磁力搅拌器。
7. 玻片电热板（45～50℃）。
8. 水浴锅［37℃和（73±1)℃］。
9. 温箱（37℃）。

10. 杂交用湿盒。
11. 玻璃电极的 pH 计。
12. 涡旋振荡器。
13. 染色缸（9）[建议型号：Wheaton Product. No. 900620]。
14. 温度计（2）（见注释 6）。
15. 定时钟。
16. 镊子。
17. 钻石笔。
18. 试管架。
19. 微量移液器（1～20μL）。
20. 无菌枪头。
21. 显微镜玻璃载玻片。
22. 22mm×22mm 玻璃盖玻片。
23. 一次性注射器（5mL）。

2.2 试剂

2.2.1 AneuVysion™ 试剂盒中提供的试剂（见注释 7）

1. LSI[4]®-13/21 DNA 探针混合物：SpectrumGreen™ 和 SpectrumOrange™ 直接标记探针混合物（见注释 8），含有 13q14 区域，21q22.13 到 21q22.2 区域的 D21S259、D21S341 和 D21S342 位点的单拷贝 DNA 序列。DNA 探针(10ng/μL)已变性，并与封闭 DNA 和杂交缓冲液混合 [二硫葡聚糖、去离子甲酰胺（见注释 9）和 SSC]。

2. CEP®-18/X/Y DNA 探针混合物：SpectrumAqua™、Spectrum Green™ 和 SpectrumOrange™ 直接标记探针混合物（见注释 8），含有 18、X 和 Y 染色体的 D18Z1、DXZ1 和 DYZ3 区域的特异性 α 卫星 DNA 序列。DNA 探针(15ng/μL)已变性，并与封闭 DNA 和杂交缓冲液混合 [二硫葡聚糖、去离子甲酰胺（见注释 9）和 SSC]。

3. DAPI-II 复染液：600μL /瓶 DAPI 在二氢氯化苯二胺、丙三醇和缓冲液中（见注释 10）。

4. NP-40：4mL 非离子型去污剂。

5. 20×SSC：氯化钠和柠檬酸钠混合物 66g。

2.2.2 AneuVysion™ 试剂盒中未提供的试剂

1. 纯水（蒸馏、去离子或 Milli-Q），室温储存。

2. 100%乙醇，室温储存。

3. 12mol/L HCl。

4. 1mol/L NaOH。

5. 超纯级甲酰胺，4℃保存 1 月。

6. 试剂纯甲醇，无水。

7. 试剂纯冰乙酸。

8. 柠檬酸钠。

9. KCl。

10. 胰蛋白酶/EDTA：0.05% 胰蛋白酶、0.53mmol/L EDTA · 4Na 溶于 Hank 平衡盐溶液（无 $CaCl_2$、$MgCl_2 \cdot 6H_2O$、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$）。

11. 橡皮泥。

2.2.3 工作液准备

1. 低渗液 1（0.8%柠檬酸钠）：将 0.8g 柠檬酸钠溶于 100mL 纯水中，混匀，室温可保存 1 个月。

2. 低渗液 2（0.56% KCl）：将 0.56g 氯化钾溶于 100mL 纯水中，混匀，室温可保存 1 个月。

3. 细胞解离液（60%乙酸）：将 1.5mL 冰乙酸溶于 1L 纯水，需要在每次制备绒毛细胞时新鲜配制。

4. 固定液（甲醇：冰乙酸＝3：1）：将甲醇和冰乙酸按 3：1 体积比混合。每批制片时新鲜配制，放于有盖的玻璃瓶内减少其水合作用。

5. 20×SSC（250mL，pH 5.3）：将 AneuVysion™ 试剂盒内配的 66g 20×SSC 混合粉末溶于 200mL 纯水中，用 12mol/L HCl 室温调 pH 至 5.3（用 pH 计测定），再用纯水定容至 250mL，室温保存 6 个月。

6. 2×SSC（250mL，pH 7.0±0.2）：将 25mL 20×SSC（pH 5.3）溶于 200mL 纯水中，用 1mol/L 的 NaOH 调 pH 至 7.0±0.2（用 pH 计测定），加纯水定容至 250mL，室温保存 6 个月。

7. 变性液 [70%甲酰胺/2×SSC（70mL，pH 7.0～8.0）]：加 49mL 甲酰胺、7mL 20×SSC（pH 5.3）、14mL 纯水于染色缸内混匀，pH 计确定室温下 pH 范围在 7.0～8.0，用 7 天后更换。4℃保存，每次使用前确认 pH。

8. 梯度乙醇洗脱液（70%、85%和 100%）：用无水乙醇和纯水按体积比 70%、85%配制。原液用密封较好的容器室温保存 6 个月，工作液一般可用一周，除非挥发或因过度使用被稀释。

9. 0.3% NP-40/0.4×SSC 洗脱液（1000mL，pH 7.0～7.5）：将 20mL 20×SSC（pH 5.3）溶于 950mL 纯水中混匀，加 3mL NP-40。用 1mol/L 的 NaOH 调 pH 至 7.0～7.5，用纯水定容至 1000mL，用带盖的容器室温保存 6 个月，用

过一天的液体扔掉。

10. 0.1% NP-40/2×SSC 洗脱液（1000mL，pH 7.0～7.5）：将 100mL 20×SSC（pH 5.3）溶于 850mL 纯水中，加 1mL NP-40 混匀。用 1mol/L 的 NaOH 调 pH 至 7.0～7.5，用纯水定容至 1000mL，未使用的液体用带盖的容器室温保存 6 个月，用过一天的液体扔掉。

3. 方法

3.1 用于 FISH 检测的未培养胎儿细胞制备

3.1.1 未培养羊水细胞的制备

1. 解冻 4mL 胰蛋白酶/EDTA。
2. 将 3～5mL 清澈的羊水样品 400*g* 离心 10min（见注释 11）。
3. 弃上清。
4. 用 4mL 胰蛋白酶/EDTA 液重悬细胞。
5. 轻柔振荡细胞悬液。
6. 37℃孵育 20min。
7. 400*g* 离心 10min。
8. 弃上清。
9. 慢慢滴入 37℃预热的低渗液（0.8%柠檬酸钠或 0.56% KCl）重悬细胞，至终体积 10mL。
10. 37℃孵育 20min。
11. 400*g* 离心 10min。
12. 弃上清。
13. 加 2mL 固定液（甲醇：冰乙酸＝3：1）重悬细胞，轻轻混匀。
14. 将细胞悬液于 2～8℃放置至少 1h 或至制片时。
15. 按细胞团块大小调整加入固定液体积：400*g* 离心 10min，弃上清，加 0.8～2mL 固定液（甲醇：冰乙酸＝3：1）重悬细胞。
16. 用钻石笔在 1 或 2 张玻片的背面标记 2 个杂交区域（见注释 12）。
17. 在每一杂交区域滴约 20μL 的细胞悬液（见注释 13 和 14）。
18. 滴好的玻片可直接变性杂交（见注释 15）或放于有盖的玻片盒内－20℃保存待用（见注释 16）。

3.1.2 未培养绒毛细胞的制备

1. 在显微镜下彻底清洗绒毛（见注释 17）。

2. 将1或2片干净的绒毛转到一个35mm的培养皿内用于FISH。

3. 吸去多余的液体。

4. 在绒毛上逐滴加2mL固定液（甲醇：冰乙酸=3：1），固定绒毛。

5. 室温孵育10min。

6. 更换2mL新鲜的固定液。

7. 室温孵育10min。

8. 移去固定液。

9. 气干绒毛。

10. 加0.5～0.8mL解离液（60%乙酸）。

11. 室温孵育5min，可用细的玻璃滴管轻轻混合以促进细胞解离，解离液加入2min后可开始准备制片。

12. 用钻石笔在1或2张玻片的背面标记2个杂交区（见注释12）。

13. 在每一标记杂交区滴约20μL的细胞悬液（见注释13和14）。

14. 滴好的玻片可直接变性杂交（见注释15）或放于有盖的玻片盒内-20℃保存待用（见注释16）。

3.2 FISH分析步骤

3.2.1 一般准备（见注释18）

1. 将用于杂交的湿盒置于37℃预热。

2. 准备37℃水浴。

3. 准备（73±1)℃水浴。

4. 将玻片电热板预热至45～50℃。

3.2.2 标本预处理（见注释19）

1. 准备40mL 2×SSC加到染色缸内，在37℃水浴锅内预热；将标本置于37℃ 2×SSC中30min。

2. 从染色缸内取出标本晾干。

3. 准备三缸室温梯度乙醇（70%、85%和100%）。

4. 将标本放入70%乙醇中2min。

5. 从70%乙醇中取出，迅速移入85%乙醇中2min。

6. 从85%乙醇中取出，迅速移入100%乙醇中2min。

7. 从染色缸中取出标本，晾干。

3.2.3 标本DNA的变性（见注释20）

1. 确认变性液pH在7.0～8.0范围内。

2. 将变性液倒入染色缸内于（73±1)℃水浴中预热至少 45min，在用前确认缸内的温度（见注释 21)。

3. 将准备好的标本（每次不超过 3 张）置于（73±1)℃变性液中变性 5min，勿晃动。

4. 准备三缸室温梯度乙醇（70%、85%和 100%)。

5. 用镊子将标本从变性液中取出后立即置于 70%乙醇处理 2min，晃动玻片去掉残留的甲酰胺。

6. 从 70%乙醇中取出，迅速移入 85%乙醇中 2min。

7. 从 85%乙醇中取出，迅速移入 100%乙醇中 2min。

8. 用吸水纸从玻片边缘吸去残留的乙醇，擦干玻片背面。

9. 在准备加探针前 2min 将玻片置于 45～50℃恒温平台。

3.2.4 准备探针混合物

1. 探针在室温条件下逐渐解冻。

2. 振荡装探针的离心管。

3. 用微型离心机稍离心（3～5s)。

3.2.5 杂交

1. 加 10μL CEP-18/X/Y 探针混合物到一个标记的杂交区域，立即盖上 22mm×22mm 盖片，让溶液在盖片下均匀铺展，避免产生气泡。

2. 加 10μL LSI-13/21 探针混合物于另一标记的杂交区域，如上所述方法盖上盖片。

3. 用稀释的橡皮泥封片：用 5mL 注射器吸入橡皮泥，沿载玻片和盖玻片重叠边缘滴加，在盖片周围封片。

4. 将玻片放入 37℃预热的湿盒，盖紧盖子，37℃杂交 6～24h。

3.2.6 杂交后洗脱（见注释 20)

1. 将 0.3%NP-40/0.4×SSC 洗脱液加入染色缸内。

2. 将装有 0.3%NP-40/0.4×SSC 洗脱液的染色缸放于（73±1)℃水浴预热至少 30min。

3. 准备 0.1% NP-40/2×SSC 洗脱液于另一染色缸内，室温备用。

4. 从杂交湿盒内取出玻片。

5. 去掉一张标本的橡皮泥和盖片。

6. 立即放于（73±1)℃的 0.3%NP-40/0.4×SSC 洗脱液内。

7. 晃动玻片 3s。

8. 重复步骤 5～7 洗脱下一张玻片。

9. 重复步骤 5～7 洗脱第三张玻片，一次洗脱不超过 3 张玻片。

10. 自最后一张玻片放入后计时洗脱 2min。

11. 将玻片逐张移入室温的 0.1%NP-40/2×SSC 洗脱液中，洗脱 5～60s。

12. 暗处晾干玻片（放于抽屉内关上即可）。

13. 每一杂交区域加 10μL DAPI-II 复染液，盖上盖片。

14. 玻片置于暗处保存待检（见注释 23）。

3.3 信号检测

3.3.1 总体评估玻片

1. 用 10×、25×和 40×物镜总体评估标本情况，转换不同滤光片评估不同颜色的信号（蓝色、橙色或绿色）。

2. 背景应该是暗的，几乎没有颗粒样荧光或模糊的影像。

3. 用 25×物镜扫描玻片，选择信号检测的合适区域。所选区域内的细胞应稀疏分布，一个视野下可以看到几个细胞，只有少数细胞重叠。避免细胞密集分布、许多细胞重叠或细胞成团的区域。

3.3.2 信号计数

1. 选择一个滤光片，用 40×物镜扫描所选区域，分析该区域的左上象限区域。自左向右扫描，并跳过细胞密集区域。

2. 计数每个间期核内的一种特异探针信号的数量。探针信号应明亮、清晰、易于观察。信号呈明亮致密或线状弥散在卵形核内。有时信号分成明亮的、距离非常近的两团，这种分开的信号可以作为一个信号计数。

3. 继续扫描至计数 50 个核，对特异靶进行分析。

4. 对 5 种探针分别重复步骤 1～3，在不同滤光片下扫描相应的杂交区域。

5. 在特定记录文件中记录结果。

6. 对每种探针拍样品照片（数字化或幻灯）。

7. 在专门设计的报告纸上报告结果，每个靶探针计数 50 个间期核，记录 LSI-13、LSI-21 和 CEP-18 出现 1 个、2 个、3 个、4 个和 4 个以上信号的细胞数量和百分比。有关性染色体的报告需具有 X、Y、XX、XY、XXY、XYY、XXX 及其他的核数量和百分比。

3.4 结果判断

1. 对一个靶信号的计数少于 50 个间期核，应进行增补实验或者判断为无

结果。

2. 如果至少85%的细胞为整倍体，确诊为整倍体。

3. 如果至少85%的细胞具有同样的非整倍体信号，确诊为非整倍体。

4. 如果超过10%的细胞具有同样的非整倍体信号，应继续分析100～200个细胞。根据绝大部分细胞中检测到的信号，FISH进行最终确诊。怀疑为嵌合体的病例，应进行标准的细胞遗传学分析。

4. 注释

1. 我们的实验操作程序主要基于其他已经发表的文献，并结合我们自身十多年的经验建立的。变性、杂交和洗脱方法基于购买的AneuVysion™分析试剂盒，总体按照Vysis建议的方法进行实验。

2. 在适合的临床条件下，快速FISH分析未培养胎儿细胞对主要常见非整倍体进行产前诊断是非常有效的工具。然而，临床医生应经过培训、患者应仔细咨询了解用FISH进行常规产前细胞遗传学分析的优势和局限性。应该强调实验不能发现结构染色体异常、嵌合体或13、18、21、X和Y之外的染色体数量异常。这些局限性也应该在FISH结果的最终报告中详细注明。

3. 本实验要求好的实验室经验和强制性学习曲线。在该技术用作临床工具之前，建议在细胞遗传学实验室中进行实验至少50～100个病例。实验过程中得到的FISH结果与作为内对照的标准细胞遗传学分析结果相比较。实验只用作学习目的，不报告给临床医生和患者。

4. ProbeCheck™阳性对照和阴性对照标本包括在AneuVysion™试剂盒中。正常男性和嵌合体羊水细胞分别作为阴性对照和阳性对照。这些对照标本可用来进行质量控制和培训技术人员对间期细胞FISH的结果判断。

5. 对成功的FISH杂交结果观察失败可能是荧光显微镜故障或状态不理想，或错误的滤光片选择造成的。应进行常规的显微镜清洁，定期由技术代表进行检查。激发光源应该正确安装，它的使用时间应该记录，使用寿命大约为200h。物镜根据放大倍数决定使用或不使用镜油。使用的镜油应该无自发荧光、专门用于荧光显微镜。建议使用适合AneuVysion™试剂盒的多带通和单带通荧光显微镜滤光片。Vysis公司备有适于各种显微镜的滤光片。用浅蓝绿色、绿色和橘黄色荧光标记CEP-18/X/Y和LSI-13/21探针杂交的染色体可以用Aqua、Green或Orange的单通道滤光片观察，也可以用DAPI/Green/Orange三通道滤光块阅片。SpectrumAqua信号呈现浅绿蓝色，SpectrumOrange信号呈现粉橘黄色，SpectrumGreen信号呈现绿黄色。其他DNA用DAPI染成蓝色。

6. 建议用校准的温度计测量溶液、水浴锅和培养箱的温度，因为这些温度对结果非常重要。

7. 未拆包装的 AneuVysion™ 试剂盒在－20℃干燥避光条件下保存。开封的试剂盒的不同组分按下述说明保存：DNA 探针混合物、DAPI-II 复染剂和对照标本在－20℃避光干燥保存；20×SSC 盐和 NP-40 室温保存。未开封试剂盒各组分的过期时间在各自的包装说明中注明，这些保存条件适用于开封和未开封的组成。

8. 荧光素在曝光后淬灭。为减少荧光淬灭，所有含有荧光团的溶液应该在弱光下操作。包括已经杂交标本的所有后续操作步骤。所有避光的操作（孵育过程、洗脱等）应在柔和光线下进行，避免强光直接照射荧光素。

9. 甲酰胺是一种众所周知的致畸剂，用于制备变性液和探针混合物。应避免皮肤和黏膜接触。

10. DAPI-II 复染剂中含有 DAPI 和 1,4-苯二胺游离碱。根据阳性基因毒性效应，DAPI 是可能的致突变剂，避免吸入、误食或皮肤接触。1,4-苯二胺是一种已知的皮炎致敏剂和潜在的呼吸致敏剂，避免吸入、误食或与皮肤接触。

11. 只用清澈的黄颜色羊水进行 FISH。血红色或褐色的羊水，或含许多红细胞的细胞团块可能影响结果，得到错误的判断。

12. 玻片应该清洁、冰冷。将玻片保存在冰箱中，滴片前用冰冷的固定液洗片。不干净的玻片导致高背景和妨碍阅片。

13. 大多数细胞遗传实验室的技术员对滴片经验丰富，然而，对间期核 FISH 实验来说，滴片是确保优质结果的重要步骤。稀疏分布的细胞限制观察者选择状态最好的细胞核来计数信号，细胞过于稠密的杂交区域很难将细胞和信号相联系。正确的滴片保证结果观察的方便和直观。在滴片前根据细胞团块的大小调节悬液体积，从尝试和错误中吸取经验，滴出高质量的标本。

14. 因为 AneuVysion™ 试剂盒由两套探针构成：LSI-13/21 和 CEP-18/X/Y，每个病例最少要求两个杂交区域。一张玻片上制备 2 个杂交区域对技术要求不是太高，但一张片子上找一个杂交区域比较简单。每张试验片最好制备一个备份，备份标本不进行杂交，放在有盖的盒子中－20℃保存。

15. 标本质量是影响杂交程度的重要因素。建议在变性和杂交前，在相差显微镜下检查标本的质量。评估玻片上的细胞密度和间期核周围细胞质的存在与否。

16. 在标本制备和操作的某些阶段可长期保存样本。未滴片的在固定液中的羊水细胞或绒毛细胞悬液可以在－20℃冷冻保存。制备好的标本在杂交前也可以保存在有盖的盒子中，放入塑料袋封口后，－20℃保存。

17. 只选择干净的绒毛进行分析。因蜕膜或母血污染的样本可能影响结果，导致错误的判断。蜕膜外观通常为白色球状组织，没有发芽或血管，它们通常具有海绵样或“糊状”外观。好的绒毛具有发芽的白色分支，至少一些分支上有血管。

18. HYBrite™变性/杂交系统是 Vysis 生产的一种按键操作仪器，它可以同时对 12 张玻片进行变性和杂交。减少对变性试剂、水浴锅和孵育设备的需求，节省大约 45min 操作时间。用 HYBrite™进行操作更简便、更安全。我们认为实验操作程序更准确，对困难样本也能得到更好的结果。

19. 标本预处理是选择性的。只有妊娠后期（超过 18 周）的羊水才需要预处理。我们采用如上所述的方法处理所有样品，再进行间期核 FISH 分析。

20. 在每个染色缸中一次不能变性或洗脱 3 张以上的标本。

21. 严格控制温度和缓冲液浓度对变性非常重要。变性液温度必须为（73±1)℃，每次使用前进行确认。变性液的 pH 在每次使用前也必须调至 7.0～8.0。

22. 对最后一次乙醇洗脱、将玻片转移到玻片电热板上以及加上探针混合物等步骤严格计时，这对杂交成功非常重要。如果在探针准备好之前，玻片需要等待超过 2min，应该将玻片放在 100％乙醇中等待杂交。

23. 杂交标本盖上盖玻片后在－20℃避光保存。在这样的保存条件下，杂交标本可以保存一年以上而荧光信号强度基本没有损失。

（吴 畏 陈 艳 译，陈德清 校）

参考文献

1. Johnson, M. P. and Miller, O. J. (1992) Cytogenetics. in: *Reproductive Risks and Prenatal Diagnosis*, (Evans, M. I., ed.), Appelton and Lange, Norwalk, CT. pp. 237–250.
2. Evans, M. I., Bottoms, S. F., Carlucci, T., Grant, J., Belsky, R. L., Solyom, A. E., et al. (1988) Determinants of altered anxiety after abnormal maternal serum alpha-fetoprotein screening. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **159,** 1501–1504.
3. Caccia, N., Johnson, J. M., Robinson, G. E., and Barna, T. (1991) Impact of prenatal testing on maternal-fetal bonding: chorionic villus sampling versus amniocentesis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **165,** 1122–1125.
4. Sjogren, B. and Uddenberg, N. (1990) Prenatal diagnosis for psychological reasons: comparison with other indications, advanced maternal age and known genetic risk. *Prenat. Diagn.* **10,** 111–120.
5. Marteau, T. M., Cook, R., Kidd, J., Michie, S., Johnston, M., Slack, J., et al. (1992) The psychological effects of false-positive results in prenatal screening for fetal abnormality: a prospective study. *Prenat. Diagn.* **12,** 205–214.
6. Goel, V., Glazier, R., Summers, A., and Holzapfel, S. (1998) Psychological outcomes following maternal serum screening: a cohort study. *Can. Med. Assoc. J.* **159,** 651–656.
7. Pergament, E., Chen, P. X., Thangavelu, M., and Fiddler, M. (2000) The clinical application of interphase FISH in prenatal diagnosis. *Prenat. Diagn.* **20,** 215–220.
8. Evans, M. I., Ebrahim, S. A., Berry, S. M., Holzgreve, W., Isada, N. B., Quintero, R. A., et al. (1994) Fluorescent *in situ* hybridization utilization for high-risk prenatal diagnosis: a trade-off among speed, expense, and inherent limitations of chromosome-specific probes. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **171,** 1055–1057.
9. Cremer, T., Landegent, J., Bruckner, A., Scholl, H. P., Schardin, M., Hager, H. D., et al. (1986) Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive *in situ* hybridization

techniques: diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84. *Hum. Genet.* **74,** 346–352.
10. Landegent, J. E., Jansen in de Wal, N., Dirks, R. W., Baao, F., and Van-der Ploeg, M. (1987) Use of whole cosmid cloned genomic sequences for chromosomal localization by non-radioactive *in situ* hybridization. *Hum. Genet.* **77,** 366–370.
11. Julien, C., Bazin, A., Guyot, B., Forestier, F., and Daffos, F. (1986) Rapid prenatal diagnosis of Down's syndrome with in-situ hybridisation of fluorescent DNA probes. *Lancet.* **2,** 863–864.
12. Pinkel, D., Straume, T., and Gray, J. W. (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83,** 2934–2938.
13. Cremer, T., Lichter, P., Borden, J., Ward, D. C., and Manuelidis, L. (1988) Detection of chromosome aberrations in metaphase and interphase tumor cells by *in situ* hybridization using chromosome-specific library probes. *Hum. Genet.* **80,** 235–246.
14. Guyot, B., Bazin, A., Sole, Y., Julien, C., Daffos, F., and Forestier, F. (1988) Prenatal diagnosis with biotinylated chromosome specific probes. *Prenat. Diagn.* **8,** 485–493.
15. Lichter, P., Cremer, T., Tang, C. J., Watkins, P. C., Manuelidis, L., and Ward, D. C. (1988) Rapid detection of human chromosome 21 aberrations by *in situ* hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85,** 9664–9668.
16. Lichter, P., Cremer, T., Borden, J., Manuelidis, L., and Ward, D. C. (1988) Delineation of individual human chromosomes in metaphase and interphase cells by *in situ* suppression hybridization using recombinant DNA libraries. *Hum. Genet.* **80,** 224–234.
17. Pinkel, D., Landegent, J., Collins, C., Fuscoe, J., Segraves, R., Lucas, J., et al. (1988) Fluorescence *in situ* hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85,** 9138–9142.
18. Robinson, A., Bender, B. G., Linden, M. G., and Salbenblatt, J. A. (1990) Sex chromosome aneuploidy: the Denver Prospective Study. *Birth Defects.* **26,** 59–115.
19. Jacobs, P. A., Melville, M., Ratcliffe, S., Keay, A. J., and Syme, J. (1974) A cytogenetic survey of 11,680 newborn infants. *Ann. Hum. Genet.* **37,** 359–376.
20. Ratcliffe, S. G., Stewart, A. L., Melville, M. M., Jacobs, P. A., and Keay, A. J. (1970) Chromosome studies on 3500 newborn male infants. *Lancet.* **1,** 121–122.
21. Klinger, K. W., Dackowski, W., Leverone, B., Locke, P., Nass, S. G., Lerner, T., et al. (1990) Prenatal detection of aneuploidy of 21, 18, 13, X or Y by interphase *in situ* hybridization. *Am. J. Hum. Genet.* **47Suppl,** A224.
22. Yu, L. C., Bryndorf, T., Christensen, B., Segraves, R., Kuo, W. L., Pinkel, D., et al. (1990) Enumeration of specific chromosomes in uncultured fetal cells using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Am. J. Hum. Genet.* **47Suppl,** A287.
23. Kuo, W. L., Tenjin, H., Segraves, R., Pinkel, D., Golbus, M. S., and Gray, J. (1991) Detection of aneuploidy involving chromosomes 13, 18, or 21, by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) to interphase and metaphase amniocytes. *Am. J. Hum. Genet.* **49,** 112–119.
24. Sawa, R., Hayashi, Z., Tanaka, T., Onda, T., Hoshi, K., Fukada, Y., et al. (2001) Rapid detection of chromosome aneuploidies by prenatal interphase FISH (fluorescence *in situ* hybridization) and its clinical utility in Japan. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* **27,** 41–47.
25. Lewin, P., Kleinfinger, P., Bazin, A., Mossafa, H., and Szpiro-Tapia, S. (2000) Defining the efficiency of fluorescence *in situ* hybridization on uncultured amniocytes on a retrospective cohort of 27,407 prenatal diagnoses. *Prenat. Diagn.* **20,** 1–6.
26. Morris, A., Boyd, E., Dhanjal, S., Lowther, G. W., Aitken, D. A., Young, J., et al. (1999) Two years' prospective experience using fluorescence *in situ* hybridization on uncultured amniotic fluid cells for rapid prenatal diagnosis of common chromosomal aneuploidies. *Prenat. Diagn.* **19,** 546–551.
27. Eiben, B., Trawicki, W., Hammans, W., Goebel, R., Pruggmayer, M., and Epplen, J. T.

(1999) Rapid prenatal diagnosis of aneuploidies in uncultured amniocytes by fluorescence *in situ* hybridization. Evaluation of >3,000 cases. *Fetal. Diagn. Ther.* **14,** 193–197.

28. Aviram-Goldring, A., Daniely, M., Dorf, H., Chaki, R., Goldman, B., and Barkai, G. (1999) Use of interphase fluorescence *in situ* hybridization in third trimester fetuses with anomalies and growth retardation. *Am. J. Med. Genet.* **87,** 203–206.
29. Thilaganathan, B., Sairam, S., Ballard, T., Peterson, C., and Meredith, R. (2000) Effectiveness of prenatal chromosomal analysis using multicolor fluorescent *in situ* hybridisation. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* **107,** 262–266.
30. Cheong Leung, W., Chitayat, D., Seaward, G., Windrim, R., Ryan, G., Barrett, J., et al. (2001) Role of amniotic fluid interphase fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis in patient management. *Prenat. Diagn.* **21,** 327–332.
31. Ulmer, R., Pfeiffer, R. A., Kollert, A., and Beinder, E. (2000) Diagnosis of aneuploidy with fluorescence *in situ* hybridization (FISH); value in pregnancies with increased risk for chromosome aberrations. *Z. Geburtshilfe. Neonatol.* **204,** 1–7.
32. Bryndorf, T., Lundsteen, C., Lamb, A., Christensen, B., and Philip, J. (2000) Rapid prenatal diagnosis of chromosome aneuploidies by interphase fluorescence *in situ* hybridization: a one-year clinical experience with high-risk and urgent fetal and postnatal samples. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **79,** 8–14.
33. Ben Khalifa, M., Mercier, S., Tachdjian, G., and Baldi, M. (1999) Diagnostic prenatal des aneuploidies chromosomiques majeures. *La Gynecologie* **42,** 60–61.
34. Cremer, A. F., Jansen in de Wal, N., Wiegant, J., Dirks, R. W., Weisbeek, P., van der Ploeg, M., et al. (1987) Non-radioactive *in situ* hybridization. A comparison of several immunocytochemical detection systems using reflection-contrast and electron microscopy. *Histochemistry* **86,** 609–615.
35. Lichter, P., Jauch, A., Cremer, T., and Ward, D. C. (1990) Detection of Down syndrome by *in situ* hybridization with chromosome 21 specific DNA probes. *Prog. Clin. Biol. Res.* **360,** 69–78.
36. Nederlof, P. M., Van der Flier, S., Wiegant, J., Raap, A. K., Tanke, H. J., Ploem, J. S., et al. (1990) Multiple fluorescence *in situ* hybridization. *Cytometry* **11,** 126–131.
37. Klinger, K., Landes, G., Shook, D., Harvey, R., Lopez, L., Locke, P., et al. (1992) Rapid detection of chromosome aneuploidies in uncultured amniocytes by using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Am. J. Hum. Genet.* **51,** 55–65.
38. Ward, B. E., Gersen, S. L., Carelli, M. P., McGuire, N. M., Dackowski, W. R., Weinstein, M., et al. (1993) Rapid prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies by fluorescence *in situ* hybridization: clinical experience with 4500 specimens. *Am. J. Hum. Genet.* **52,** 854–865.
39. Ledbetter, D. H. (1992) The 'colorizing' of cytogenetics: is it ready for prime time? *Hum. Mol. Genet.* **1,** 297–299.
40. American College of Medical Genetics (1993) Prenatal interphase fluorescence *in situ* hybridization (FISH) policy statement. *Am. J. Hum. Genet.* **53,** 526–527.
41. Ward, B. E., Gersen, S. L., Theve, R., Wright, M., and Carelli, M. P. (1999) Rapid prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies by fluorescence *in situ* hybridization: clinical experience on 10,000 specimens, in: *Introduction to Fluorescence* in situ *Hybridization: Principles and Clinical Applications*, (Andreeff M. and Pinkel D., eds.), Wiley-Liss, Inc., New York, NY. pp. 409–428.
42. Bryndorf, T., Christensen, B., Vad, M., Parner, J., Brocks, V., and Philip, J. (1997) Prenatal detection of chromosome aneuploidies by fluorescence *in situ* hybridization: experience with 2000 uncultured amniotic fluid samples in a prospective preclinical trial. *Prenat. Diagn.* **17,** 333–341.

43. Bryndorf, T., Christensen, B., Vad, M., Parner, J., Carelli, M. P., Ward, B. E., et al. (1996) Prenatal detection of chromosome aneuploidies in uncultured chorionic villus samples by FISH. *Am. J. Hum. Genet.* **59,** 918–926.
44. Bryndorf, T., Christensen, B., Xiang, Y., Philip, J., Yokobata, K., Bui, N., et al. (1994) Fluorescence *in situ* hybridization with a chromosome 21-specific cosmid contig: 1-day detection of trisomy 21 in uncultured mesenchymal chorionic villus cells. *Prenat. Diagn.* **14,** 87–96.
45. Strovel, J. W., Lee, K. D., Punzalan, C., and Schwartz, S. (1992) Prenatal diagnosis by direct analysis of uncultured amniotic fluid and chorionic villus cells using interphase fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Am. J. Hum. Genet.* **51,** A12.
46. Verlinsky, Y., Ginsberg, N., Chmura, M., Freidine, M., White, M., Strom, C., et al. (1995) Cross-hybridization of the chromosome 13/21 alpha satellite DNA probe to chromosome 22 in the prenatal screening of common chromosomal aneuploidies by FISH. *Prenat. Diagn.* **15,** 831–834.
47. Lapidot-Lifson, Y., Lebo, R. V., Flandermeyer, R. R., Chung, J. H., and Golbus, M. S. (1996) Rapid aneuploid diagnosis of high-risk fetuses by fluorescence *in situ* hybridization. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **174,** 886–890.
48. Mercier, S. and Bresson, J. L. (1995) Prenatal diagnosis of chromosomal aneuploidies by fluorescence *in situ* hybridization on uncultured amniotic cells: experience with 630 samples. *Ann. Genet.* **38,** 151–157.
49. D'Alton, M. E., Malone, F. D., Chelmow, D., Ward, B. E., and Bianchi, D. W. (1997) Defining the role of fluorescence *in situ* hybridization on uncultured amniocytes for prenatal diagnosis of aneuploidies. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **176,** 769–774.
50. Cacheux, V., Tachdjian, G., Druart, L., Oury, J. F., Serero, S., Blot, P., et al. (1994) Evaluation of X, Y, 18, and 13/21 alpha satellite DNA probes for interphase cytogenetic analysis of uncultured amniocytes by fluorescence *in situ* hybridization. *Prenat. Diagn.* **14,** 79–86.
51. Tepperberg, J., Pettenati, M. J., Rao, P. N., Lese, C. M., Rita, D., Wyandt, H., et al. (2001) Prenatal diagnosis using interphase fluorescence *in situ* hybridization (FISH): 2-year multicenter retrospective study and review of the literature. *Prenat. Diagn.* **21,** 293–301.
52. American College of Medical Genetics, and American Society of Human Genetics (2000) Technical and clinical assessment of fluorescence *in situ* hybridization: an ACMG/ASHG position statement. I. Technical considerations. Test and Technology Transfer Committee. *Genet. Med.* **2,** 356–361.
53. Cai, L. S., Lim, A. S., and Tan, A. (1999) Rapid one-day fluorescence *in situ* hybridisation in prenatal diagnosis using uncultured amniocytes and chorionic villi. *Ann. Acad. Med. Singapore* **28,** 502–507.
54. Evans, M. I., Klinger, K. W., Isada, N. B., Shook, D., Holzgreve, W., McGuire, N., et al. (1992) Rapid prenatal diagnosis by fluorescent *in situ* hybridization of chorionic villi: an adjunct to long-term culture and karyotype. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **167,** 1522–1525.
55. Fiddler, M., Frederickson, M. C., Xien Chen, P., and Pergament, E. (2001) Assessment of fetal status in multiple gestation pregnancies using interphase FISH. *Prenat. Diagn.* **21,** 196–199.
56. Philip, J., Bryndorf, T., and Christensen, B. (1994) Prenatal aneuploidy detection in interphase cells by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *Prenat. Diagn.* **14,** 1203–1215.
57. Saura, R., Roux, D., Maugey-Laulon, B., Taine, L., Wen, Z. Q., Vergnaud, A., et al. (1998) False-negative results of trisomy 21 on direct analysis on chorionic villus sampling. *Prenat. Diagn.* **18,** 866–867.
58. Thein, A. T., Abdel-Fattah, S. A., Kyle, P. M., and Soothill, P. W. (2000) An assessment of the use of interphase FISH with chromosome specific probes as an alternative to cyto-

genetics in prenatal diagnosis. *Prenat. Diagn.* **20,** 275–280.
59. Feldman, B., Ebrahim, S. A., Hazan, S. L., Gyi, K., Johnson, M. P., Johnson, A., et al. (2000) Routine prenatal diagnosis of aneuploidy by FISH studies in high-risk pregnancies. *Am. J. Med. Genet.* **90,** 233–238.
60. Isada, N. B., Hume, R. F., Jr., Reichler, A., Johnson, M. P., Klinger, K. W., Evans, M. I., et al. (1994) Fluorescent *in situ* hybridization and second-trimester sonographic anomalies: uses and limitations. *Fetal. Diagn. Ther.* **9,** 367–370.
61. Spathas, D. H., Divane, A., Maniatis, G. M., Ferguson-Smith, M. E., and Ferguson-Smith, M. A. (1994) Prenatal detection of trisomy 21 in uncultured amniocytes by fluorescence *in situ* hybridization: a prospective study. *Prenat. Diagn.* **14,** 1049–1054.
62. Cooper, M. L., Redman, J. B., Mensing, D. E., and Cheung, S. W. (1998) Prenatal detection of chromosome aneuploidies in uncultured amniocytes by FISH: Advantages and limitations. *Am. J. Hum. Genet.* **63,** A161.
63. Jalal, S. M., Law, M. E., Carlson, R. O., and Dewald, G. W. (1998) Prenatal detection of aneuploidy by directly labeled multicolored probes and interphase fluorescence *in situ* hybridization. *Mayo Clin. Proc.* **73,** 132–137.
64. Verlinsky, Y., Ginsberg, N., Chmura, M., White, M., Strom, C., and Kuliev, A. (1998) Detection of translocations involving the Y-chromosome in prospective prenatal screening of common chromosomal aneuploidies by FISH. *Prenat. Diagn.* **18,** 390–392.
65. Eiben, B., Trawicki, W., Hammans, W., and Epplen, J. T. (1999) False-negative finding in rapid interphase FISH analysis of uncultured amniotic cells. *Prenat. Diagn.* **19,** 892–893.
66. Estabrooks, L. L., Sapeta, M., Lytle, C., Challinor, P., Dietrich-Cook, H., Crenshaw, D., et al. (1999) Prenatal interphase FISH using the AneuVysion probe set in over 10,000 samples. *Am. J. Hum. Genet.* **65(Suppl),** A162.
67. Meyer, L. M., Ramin, K. D., Ramsey, P. S., Ogburn, P. L., and Jalal, S. M. (2000) Fluoresent *in situ* hybridization technique for the rapid detection of chromosomal abnormalities. *Obstet. Gynecol.* **95,** S64.
68. Bink, K., Pauer, H. U., and Bartels, I. (2000) Interphase FISH test as a rapid test for trisomies in amniotic fluid—results of a prospective study. *Z. Geburtshilfe. Neonatol.* **204,** 8–13.
69. Robertson, S., Jackle, B., Cathey, L., Merant, L., Pittman, A., and Pattenati, M. J. (1998) Prenatal interphase aneuploidy detection in uncultured amniocytes using fluorescence *in situ* hybridization (FISH). *J. Assoc. Genet. Tech.* **24,** 151.
70. Evans, M. I., Henry, G. P., Miller, W. A., Bui, T. H., Snidjers, R. J., Wapner, R. J., et al. (1999) International, collaborative assessment of 146,000 prenatal karyotypes: expected limitations if only chromosome-specific probes and fluorescent in-situ hybridization are used. *Hum. Reprod.* **14,** 1213–1216.
71. Feldman, B., Ebrahim, S. A., Gyi, K., Flore, L. A., and Evans, M. I. (2000) Rapid confirmation of previously detected prenatal mosaicism by fluorescence *in situ* hybridization in interphase uncultured amniocytes. *Genet Test.* **4,** 61–63.
72. American College of Medical Genetics (1999) Interphase/nuclear fluorescence *in situ* hybridization (nuc ish). in: *Standards and guidelines for clinical genetics laboratories. 2nd ed.*
73. Hsu, L. Y. F. (1992) Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities through amniocentesis, in: *Genetic disorders and the fetus: diagnosis, prevention and treatmen* (Milunsky, A., ed.), Johns Hopkins University Press, Baltimore, ML. pp. 190–210.
74. Winsor, E. J., Silver, M. P., Theve, R., Wright, M., and Ward, B. E. (1996) Maternal cell contamination in uncultured amniotic fluid. *Prenat. Diagn.* **16,** 49–54.
75. Christensen, B., Bryndorf, T., Philip, J., Xiang, X., and Hansen, W. (1993) Prenatal diagnosis by *in situ* hybridisation on uncultured amniocytes: Reduced sensitivity and potential

risk of misdiagnosis in blood stained samples. *Prenat. Diagn.* **13,** 581–587.

76. Rebello, M. T., Abas, A., Nicolaides, K., and Coleman, D. V. (1994) Maternal contamination of amniotic fluid demonstrated by DNA analysis. *Prenat. Diagn.* **14,** 109–112.
77. Benn, P. A. and Hsu, L. Y. (1983) Maternal cell contamination of amniotic fluid cell cultures: results of a U. S. nationwide survey. *Am. J. Med. Genet.* **15,** 297–305.
78. Nuss, S., Brebaum, D., and Grond-Ginsbach, C. (1994) Maternal cell contamination in amniotic fluid samples as a consequence of the sampling technique. *Hum. Genet.* **93,** 121–124.
79. Moskowitz, J., Ward, B. E., and Weinstein, M. (1993) Optimized amniocentesis methods enhance performance of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for prenatal diagnosis. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **168,** 394.
80. Estabrooks, L. L., Hanna, J. S., and Lamb, A. N. (1999) Overwhelming maternal cell contamination in amniotic fluid samples from patients with oligohydramnios can lead to false prenatal interphase FISH results. *Prenat. Diagn.* **19,** 179–181.
81. Winsor, E. J., Dyack, S., Wood-Burgess, E. M., and Ryan, G. (1999) Risk of false-positive prenatal diagnosis using interphase FISH testing: hybridization of alpha-satellite X probe to chromosome 19. *Prenat. Diagn.* **19,** 832–836.
82. Thangavelu, M., Chen, P. X., and Pergament, E. (1998) Hybridization of chromosome 18 alpha-satellite DNA probe to chromosome 22. *Prenat. Diagn.* **18,** 922–925.
83. Tardy, E. P. and Toth, A. (1997) Cross-hybridization of the chromosome 13/21 alpha satellite DNA to chromosome 22 or a rare polymorphism? *Prenat. Diagn.* **17,** 487–488.
84. Thangavelu, M., Chen, P. X., and Pergament, E. (1998) Cross-hybridization of the chromosome13/21 alpha-satellite DNA probe to chromosome 22. *Prenat. Diagn.* **18,** 831–834.
85. Weier, H. U. and Gray, J. W. (1992) A degenerate alpha satellite probe, detecting a centromeric deletion on chromosome 21 in an apparently normal human male, shows limitations of the use of satellite DNA probes for interphase ploidy analysis. *Anal. Cell. Pathol.* **4,** 81–86.
86. Seres-Santamaria, A., Catala, V., Cuatrecasas, E., and Villanueva, R. (1993) Fluorescent in-situ hybridisation and Down's syndrome. *Lancet.* **341,** 1544.
87. Mizunoe, T., and Young, S. R. (1992) Low fluorescence alpha satellite region yields negative result. *Prenat. Diagn.* **12,** 549–550.
88. Bossuyt, P. J., Van Tienen, M. N., De Gruyter, L., Smets, V., Dumon, J., and Wauters, J. G. (1995) Incidence of low-fluorescence alpha satellite region on chromosome 21 escaping detection of aneuploidy at interphase by FISH. *Cytogenet. Cell. Genet.* **68,** 203–206.
89. Verma, R. S. and Luke, S. (1992) Variations in alphoid DNA sequences escape detection of aneuploidy at interphase by FISH technique. *Genomics.* **14,** 113–116.

第 17 章　用母体血进行染色体异常的产前诊断

Farideh Z. Bischoff, Dianne X. Dang, Dorothy E. Lewis, Joe Leigh Simpson

1. 引言

胎儿染色体非整倍体可通过荧光原位杂交（FISH）分析母血中的完整胎儿细胞进行诊断。由于在妊娠的整个过程中进入母血的胎儿细胞数极少（平均为 10^4～10^6 个母血细胞中有 1 个胎儿细胞），且没有分辨这些细胞是母亲细胞还是胎儿细胞的胎儿特异性标记物。要成功的对母血中的胎儿细胞进行分析，依赖于通过某些方法富集的胎儿细胞进行 FISH 检测探针的杂交和检测效率。为此，出现了一些用一种或几种技术富集、提高胎儿细胞纯度的方法以进行随后的 FISH。通过细胞富集后进行 FISH 分析过程较复杂，也并非 100%有效。因为要获得理想的信号，根据富集的异源细胞混合物中的不同类型细胞需要不同的 FISH 条件。另外，富集细胞过程所需的方法，如细胞的固定和保存，会反过来影响用于 FISH 分析的细胞质量。本章将集中讨论从母血中获得胎儿细胞过程中可能影响 FISH 分析的可变因素。详细的实验方法由 Baylor 医学院提供。本章未涉及用 PCR 分析胎儿 DNA 的胎儿细胞获得技术，但推荐了最近几篇相关的综述[1～3]。

1.1　FISH 在母血中胎儿细胞的应用

在美国，对年龄 35 岁及以上的孕妇在分娩时进行产前细胞遗传学诊断认为是“常规福利”。通过侵入性的方法，如微绒毛取样或羊膜穿刺获得胎儿细胞。很长时间以来进行这些程序武断地以 35 岁为界线，主要考虑到发生最常见的常染色体非整倍体（21 三体）的相对风险和由进行这些程序造成的流产可能性。尽管微绒毛取样和羊膜穿刺术两种方法诊断方法都比较准确且相对安全，但对 21 三体的发病率影响相当小，因为患唐氏综合征的新生儿中 80%的母亲年龄小于 35 岁[4, 5]。而且，在美国也只有约一半的 35 岁以上的高龄孕妇做侵入性的产前诊断。鉴于此，35 岁以下的孕妇应该作母体血清分析筛查，以决定是否进行侵入性的产前诊断检查。在普通人群中约 65%的人接受这种非侵入性的检查，

年轻孕妇接受检查的比例更少[6~8]。应用 FISH 对母亲血中的胎儿细胞进行胎儿染色体异常（主要是非整倍体）的检测，为所有孕妇提供了可供选择的非侵入性的检查方法，其假阳性率低于普通血清学筛查的 5%[9~12]。不同于其他筛查方法，母亲血中的胎儿细胞能提供妊娠过程中胎儿细胞的直接评估结果，从而为尽可能多的夫妇提供更为清晰的遗传咨询。

1.1.1 非整倍体检测

用 FISH 完成的胎儿非整倍体的诊断主要包括 13、18、21 三体[13~17]。早期研究应用多次 FISH 或多色 FISH 方法能同时检测 3 条染色体（染色体 X、Y、通常再加上 21 或 18），然而，对普通人群有效的产前诊断要求能同时检测所有常见的非整倍体，包括 X、Y、13、18 和 21[18]。因此，我们建立了一种在一次杂交反应中可同时检测这 5 条染色体的五色 FISH 实验方法[19]。经过对 300 多例母血样本进行检测，表明我们的 FISH 策略中所有 5 种探针的杂交效率在 90%以上，X、Y 探针的假阳性率为 4%，常染色体非整倍体的假阳性率均小于 1.5%[11, 20]。在随后证实在 13、18 和 21 三体的胎儿病例中，我们的确诊率分别为 33%（3 例有 1 例被确诊）、55%（9 例中有 5 例被确诊）、37%（16 例中有 6 例被确诊）；非整倍体细胞数量在 1 或 2 个（大多数病例）到 32 个之间。我们的低假阳性率很大程度上得益于直接标记探针的应用和胎儿细胞富集方案的严格程度。我们正在继续做临床试验，进一步评价这种颇具吸引力的方案的可行性及可靠性。

1.1.2 嵌合现象

在研究的样本中具有不同染色体组成的胎儿细胞中观察到低程度的胎儿细胞嵌合现象，这些异常细胞不是源自母体。我们曾报道一例嵌合体病例，用流式细胞分析的 2000 个性染色体为 XX 的母体细胞中，发现有 XY [2] 和 XXY [7] 核型的细胞[21]。对该病例进行微绒毛膜细胞培养后的细胞遗传学分析，显示为正常男性 XY 核型；对其中的一块细胞爬片上的 250 个细胞进行仔细的 FISH 分析，发现低比率的 XXY 嵌合核型（4 个细胞），但第二块细胞爬片上未发现此现象。因此，在一些母源性样本中发现异常胎儿细胞似乎反映了选择性排除异常胚胎细胞系的生物学机制，推测这种现象与限制性胎盘嵌合现象可以同时观察到[22]。

1.1.3 平衡易位

FISH 还曾用于为一例为 46，XX，t（1；6）（p31；q14）平衡易位核型的母亲进行产前诊断以排除胎儿非整倍体[23]。用 FACS 法筛选 γ-珠蛋白或 β-珠蛋白阳性细胞，对富集到的细胞核进行性别、1 号和 6 号染色体数目的鉴定。结果

X、1和6号染色体均为两个信号，初步排除胎儿核型为非整倍体的可能，但直到分娩后才得以确诊。对母亲血中的胎儿细胞进行FISH分析，为有反复流产史又拒绝进行产前检测的夫妇进行产前诊断提供了新的选择。

1.2 妊娠时期

巢式PCR研究发现，怀孕6周（胚胎发生4周）起在孕妇血中就能检查到胎儿Y染色体特异性DNA[24]。根据Lo等的报道，孕妇血中存在细胞外游离的胎儿DNA，所以PCR结果并不能肯定有完整的胎儿细胞存在[25]。然而，在怀孕10～15周时，PCR能够持续检测到Y特异性序列[26,27]。在此孕期内，完整细胞肯定存在，可以被FISH方法检测到[28,29]。各种不同的富集方法可以用于收集完整胎儿细胞，进行FISH分析检测。

1.3 胎儿细胞类型

几种不同类型的胎儿细胞（胚胎滋养层细胞、粒细胞、淋巴细胞和有核红细胞）存在于母亲血中[30～36]。滋养层细胞为多核或无核，将会显著影响用间期核FISH方法检查非整倍体[37]。用胎儿淋巴细胞诊断将有可能有前次妊娠残留的胎儿细胞影响，导致误诊[38,39]；这种情况尤其有可能发生在前次妊娠因染色体异常而流产时。由于胎儿有核红细胞（nRBC或有核红细胞）具有特殊的形态特征、占8周胎儿红细胞的10%以及成年人外周血中几乎不存在等特点，因此使之成为最有吸引力的候选细胞类型。利用有核红细胞特异性标记物有助于识别nRBC[40]。不存在胎儿特异性的标记物，因为PCR研究发现母血中的有核红细胞仅50%为胎儿来源[41]。另外，由于胎儿有核红细胞的核在5～7天后消失，所以发现的胎儿有核红细胞不可能是来自前次妊娠残留的细胞。所以，我们和其他一些研究者都集中在建立收集胎儿有核红细胞用于FISH检测的方法。

1.4 胎儿细胞频率

1.4.1 妊娠期内

据报道，细胞染色发现胎儿有核细胞与母亲血中有核细胞的比率为$1:4.75\times10^6\sim1:1.6\times10^7$[42]。用全血涂片进行FISH发现在妊娠早、中、晚期，胎儿细胞（包括所有类型）在母亲血中的频率分别为0.27×10^6、3.52×10^6和8.56×10^6[27]。Bianchi等[43]用定量PCR研究发现每毫升母血中有1或2个胎儿细胞，并得到类似的估计结果。他们的进一步研究显示，若胎儿为非整倍体，母血中的

胎儿细胞比率明显上升，和此前我们观察到的结果一致[44]。已经观察到惊厥前期和胎儿发育受到严重限制的孕妇血中收集得到的胎儿细胞明显增多[45~47]。无论如何，得到的胎儿细胞数量少说明需要进行某些富集过程以提高胎儿细胞的纯度，尽量减少偶然混杂的母源细胞，以免影响 FISH 结果分析。准确性和实际诊断中也并非要求 100%的纯度。

1.4.2 胎儿细胞在妊娠后母体中残留

几项研究报道淋巴样胎儿细胞在产后妇女体内可持续存在长达 27 年，可能与某些自身免疫性疾病有关[39,48~50]。尽管收集的胎儿细胞有可能混杂有前次妊娠的胎儿细胞，但用适当的方法可以将这种干扰减到最小。在 33 例有男胎妊娠史（14 个月到 19 年）而此次为女胎的病例中，我们用胎儿血红蛋白的 CD71 转铁蛋白受体或 γ-珠蛋白通过 FACS 分离胎儿细胞[51]。用 FISH 检测 X、Y 染色体，我们发现其中 32 例未发现 Y 染色体；另外 1 例计数到 5 个 XY 细胞。这些结果说明：以往妊娠的胎儿有核红细胞存留量很少，用略述的选择标准不太可能在未来妊娠时收集到。

1.4.3 在侵入性检查前取样

在侵入性检查后（如绒毛膜取样），母血循环中的实际胎儿细胞数目可能增多[52]。合理的解释是侵入性操作导致母亲和胎儿之间的血液互换。所以，若要评估母血中的胎儿细胞比率，必须在侵入性检查之前或之后至少两周以后取血。

1.5 收集胎儿细胞过程中可能影响 FISH 的实验方案

由于胎儿细胞在母血中数量少，故通常需要先富集胎儿细胞才能进行 FISH 分析。在多数策略中富集过程是依次进行的。在有些步骤中细胞处于可能影响到接下来 FISH 效果的条件下。

1.5.1 初始分离

初步分离如 Ficol-Paque 或 Percoll 密度梯度离心法通常用于除去成熟红细胞和粒细胞，留下外周血单核细胞。不同的密度梯度可能影响收集到的细胞类型、数量和质量[53~55]。事实上，我们观察到将 Ficol 的密度逐步增加（从1.070g/mL 到 1.090g/mL 再到 1.119g/mL），使收集到的细胞比例增加，但同时细胞团块增多。

1.5.2 富集

进一步的富集通常是用磁化激活细胞法分离（MACS）[56,57]方法进行、利用

磁铁磁场得到铁磁流体悬液[58]、电流分离[59]或荧光活化细胞分选(FACS)[60～63]。一般原理是利用单克隆抗体识别细胞表面抗原和（或）细胞内蛋白质，按照阴性和（或）阳性的筛选标准，从而去除母源性的细胞或收集胎儿细胞。尽管上述的所有方法都能成功地分离出胎儿细胞，但没有一种方法能将胎儿细胞100%富集。

1.5.3 抗体选择

我们及其他一些实验室用转铁蛋白受体CD71和（或）HbF的γ-珠蛋白链作为待选细胞的阳性标记[63～66]。也曾尝试其他一些抗体，但几乎没能同时得到理想的细胞富集及接下来的FISH [67～70]。最初，我们们还尝试了用GPA筛选，效果似乎不错，但随后我们发现常作为红细胞标记的抗血型糖蛋白A的几批抗体得到的结果都出现细胞团块[62,71]（见注解4）。

1.5.4 细胞分类前的固定和保存

依据所用的实验方案，细胞不可避免地受可能降低后续FISH的结果质量因素的影响，这些因素包括许多洗脱步骤、强固定、离心及保存条件。在用FACS进行细胞分类之前，用多聚甲醛固定以保护荧光素抗体，然后分批4℃保存。若多聚甲醛的浓度超过3%，抗体染色和核形态保持良好；然而，FISH探针可能难以穿透收集到的细胞核。降低多聚甲醛的浓度（1%～2%）可使探针对细胞核的穿透性较好，然而，相对温和的固定条件使细胞在4℃的保存时间相对缩短[72]。这些实验观察反映了细胞遗传学家的困扰，即保持细胞固定、离心和制备玻片标本前保存之间的平衡。我们研究小组的经验是用3%多聚甲醛固定1h后用于细胞分类及FISH最理想[72]。我们还发现，在细胞分类前细胞保存若超过10天，FISH效果不佳。其他富集细胞的方法如MACS，筛选细胞对标记和固定条件的要求不必非常严格。然而，在相对温和的条件下，细胞群的纯度也反过来受到影响，收集到用于FISH的母体细胞的比例将有所增加。

1.5.5 影响FISH的富集细胞的特征

FISH是一项灵敏的技术，能发现并分析罕见细胞，有可能直接独立分析每一个收集到的胎儿细胞。如前所述，胎儿细胞的富集不可能达到100%纯化，不可避免地会混有源于母体的红细胞、淋巴细胞、粒细胞。已有建议用自动标本扫描仪以定位数量很少的有核红细胞，但还未能有商业化的仪器[73～75]。在发现一种胎儿细胞特异性的标记物之前，还是需要对所有或大部分收集到的细胞进行分析。要发展一种特异性的针对收集到的细胞的FISH方法较复杂，而且，收集到的细胞大部分不是靶细胞类型。细胞遗传学家们知道，为获得理想稳定的探针杂交效率和信号强度，不同的细胞类型通常要求不同的FISH的实验条件。不同于

用多色 FISH 方法分析未培养的羊水细胞，其细胞较均一；当进行 FISH 分析的标本中存在有多种细胞类型，选择位点特异性探针和重复序列的探针组合是折中的选择。在用五色 FISH 对 FACS 法收集到的细胞进行 X、Y、13、18、21 号染色体分析时，我们发现特异序列探针的杂交效率（75%～85%）比 α 卫星重复序列探针的杂交效率[19]（>95%）低。尽管杂交效率下降理论上可能是由于探针（信号）大小引起，但在对照的细胞标本上并未发现这一现象。由于收集到的细胞不可避免的存在多种细胞类型，所以采用能同时分析所有细胞的 FISH 方法尤为重要，尽管不同细胞的信号质量（亮度和大小）可能不同，但能对收集到的每一个细胞进行判断。

1.6 从母血中区分胎儿细胞的实验方案

对存在于母血中的少数胎儿细胞进行准确的遗传学诊断依赖于观察者从母血细胞背景中分辨胎儿细胞的识别能力。为了进一步减少 FISH 分析的核数量，有人采用免疫组织化学染色技术从母血有核红细胞中区分胎儿有核红细胞[76～83]。Zheng 等[76]用小鼠抗胎儿血红蛋白抗体、Y 染色体探针进行免疫组织化学染色和 FISH 共分析。然而，收集的部分母血细胞对 HbF 染色也呈阳性反应。假定外周血中 50%的有核红细胞为胎儿来源且适合 FISH 分析[41]，通过形态学和染色对候选细胞进行扫描和定位的自动方法令人期待[75]。但令人沮丧的是，用于检测珠蛋白链和（或）形态染色的试剂中含的防腐剂会影响 FISH 效果。

2. 实验材料

2.1 流式细胞分选

2.1.1 一般试剂

1. Ficoll 淋巴细胞分离液（密度为 1.077）（Gallard Schlesinger，Carle Place，NY，目录号为 T1000）。

2. 10× PBS 溶液：137mmol/L NaCl、27mmol/L KCl、43mmol/L KH_2PO_4、14mmol $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$ 溶于去离子水中，用 0.22μm 的滤膜过滤除菌，室温保存 1 个月。

3. 1×PBS 溶液：用去离子水稀释 10×PBS 溶液，用 0.22μm 的滤膜过滤除菌，4℃保存，用前先预热至室温。

4. PBS-EDTA（PBSE）：溶解 0.0372g 试剂级的 EDTA 于 100mL 1× PBS 中，用 0.22μm 的滤膜过滤除菌，4℃保存，用前先预热至室温。

5. 0.4%台盼蓝溶液：溶解 0.4g 台盼蓝（Sigma，St. Louis，MO，目录号为 T0776）于 100mL 去离子水，用 0.22μm 的滤膜过滤除菌，室温保存。

2.1.2 去除 $CD3^+$ 和 $CD13^+$ 母体细胞

1. CD3、CD13 抗体均用生物素标记（Biodesign International，Kennebunk，ME，目录号为 P01106B 和 P01150B）。

2. 量化链霉亲和素磁化微粒（Clemente Associates，Madison，CT，目录号为 SAB250），4℃保存。

3. 磁化稀土（Clemente Associates，Madison，CT）。

4. PBSF/2%FBS 溶液：加 10mL 热灭活的胎牛血清于 490mL PBSE 中，用 0.22μm 的滤膜过滤除菌，4℃保存 1 个月，用前先预热至室温。

5. PBSE/5%FBS 溶液：加 25mL 灭活的胎牛血清于 475mL PBSE 中，用 0.22μm 的滤膜过滤除菌，4℃保存 1 个月，用前先预热至室温。

6. 计算好每个样品所需微粒数，按此准备，微粒终浓度为 $5\mu g/10^6$ 个细胞。将所需要的微粒量（300～400μL）加入 15mL 聚酯离心管内，用 PBSE/5%FBS 按 1∶100 的比例稀释混匀。用磁力分离出微粒，用移液管小心将微粒移至新的 15mL 管中，弃上清。

2.1.3 CD71 和 CD45 细胞表面染色

1. FITC 标记的 CD71 膜抗体（Becton Dickinson，San Jose，CA，目录号为 347513）；PE 标记的 CD45 膜抗体（KC56-RD1）（Coulter Corp.，Hialeah，FL，目录号为 6603839），用 PBSF/2%FBS 溶液稀释至 0.1mg/mL，4℃保存 1 个月（见注释 1）。

2. 4%多聚甲醛溶液：加 4.0g 多聚甲醛（试剂级）到 90mL 去离子水中，调 pH 到 10.0 使之溶解。加入 10mL 10×PBS（终浓度为 4.0g/100mL 1×PBS），用 0.22μm 的滤膜过滤除菌，4℃保存。

3. 用 1×PBS 3∶1 稀释 4%多聚甲醛配制成 3%多聚甲醛，4℃保存。

2.1.4 流式细胞分选 $CD71^+$ 细胞和 $CD45^-$ 细胞

1. EPICS Model 753（Coulter Corp.）装备在 Cicero 高速分类系统上（Cytomation，Inc.，Ft. Collins，CO）。

2. 氩离子激光（Coherent Inc.，Palo Alto，CA）。

3. 3×Quartz SortSense 有 100μm 孔径的石英细胞流动室喷嘴和 Profile 抓取镜头（Coulter Corp.）。

4. 光学滤光片包括一种 457～502nm 的宽带激光阻断滤光片，一种 550nm 二色滤光片透过 FITC 激发光到一种 525nm 带通滤光片，折射 PE 激发光到一种

575nm 带通滤光片。

5. Isoton II sheath 溶液（Coulter Corp.）。

6. 高压无菌的小离心管和洁净的硅烷化（带正电核）玻璃载玻片。

2.2 FISH

2.2.1 细胞固定、DNA 脱水和变性

1. Carnoy 固定液：100mL 甲醇∶冰乙酸按体积比 3∶1 新鲜配制备用（30min 以内使用）。

2. 乙醇溶液（70%、90%和 100%）：用去离子水稀释无水乙醇得到 70%、90%（V/V）乙醇，各准备两瓶（500mL），一瓶室温保存，另一瓶−20℃保存。

3. 20×SSC 溶液：将已称量混好的粉末（Oncor，Gaithersburg，MD，目录号为 S4073）溶于 1L 去离子水。

4. 70%甲酰胺/2×SSC 变性液：使用前新鲜配制，准备 50mL 带盖的染色缸，加 28mL 甲酰胺［Fisher Scientific（超纯分子生物学级）（Pittsburg，PA，目录号为 F84-1)］、4mL 20×SSC 及 8mL 去离子水混匀。先在 43℃水浴预热后转移至 70℃水浴，以防止染色缸炸裂。

2.2.2 五色 FISH

1. 选购直标探针，经过比较几个生产商后，我们选择了特异性和质量最好的直标探针（Vysis，Inc.；Downers Grove，IL)。其探针长度合适、荧光信号清晰，且能同时分析 X、Y、13、18、21 五条染色体。其中 3 个是 α 卫星着丝粒特异性探针（CEP)、2 个是位点特异性探针（LSI)，包括 CEP X SpectrumGreen™、CEP X SpectrumOrange™、CEP Y SpectrumAqua™、CEP18 SpectrumAqua™、CEP18 Spectrum Orange™、LSI13 SpectrumGreen™，LSI21 SpectrumOrange™（Vysis，Inc.)。探针必须−20℃避光冷冻保存，不用分装。

2. 为优化我们的五色 FISH 方案，X、Y、13、18、21 号染色体荧光信号分别显示黄、蓝、绿、粉红、红/橙色。因此，在准备 5 个探针混合物之前，为产生黄色和粉红色两个荧光信号，必须将 X、18 号染色体的探针预先混合，即 CEPX SpectrumGreen™和 CEPX SpectrumOrange™等量（各 5μL）混合，最后将合成黄色信号；而 CEP18 SpectrumAqua™和 CEP18 SpectrumOrange™等量混合后，最后合成粉红色信号。混好的探针−20℃避光保存。

3. 对每张玻片上 22mm×22mm 的杂交区域，需要 10μL 的探针混液，包括 LSI 13 和 21 各 0.5μL，预先混好的 CEP X、CEP18 和 CEP Y 各 0.3μL，1μL 去离子水，7.1μL LSI™探针缓冲液（随 LSI 探针一起提供)，加于消毒的微量离

心管中混匀。

4. 做 FISH 实验前，先准备 37℃湿盒：选有盖且密封好的塑料盒，在盒中间放两段塑料移液管尖架子，加约 1/10 体积的水，放置于 37℃温箱预热。

5. 2×SSC 溶液：用去离子水稀释 20×SSC 液，调 pH 至 7.0，可室温保存 6 个月。

6. 1×PBD 溶液：用去离子水稀释 10×PBD™（Oncor，Gaithersburg，MD，目录号为 S1370-7），4℃保存 6 个月。

7. 溶于抗淬灭剂溶液的 DAPI（4′,6-diamidino-2-phenylindole）II 复染液（125ng DAPI/mL）（Vysis，Inc.，Downers Grove，IL，目录号为 32-804831）。

8. 可放在 4℃保存标本的玻片盒中。

2.2.3 显微分析

1. Axiophot 或 Axioskop 荧光显微镜，配有照相机和 40×及 100×的物镜（Carl Zeiss，Inc.，Thornwood，NY）。

2. 适合观察 DAPI 的单带通滤光片（Omega Optical，Brattleboro，VT）及观察蓝/绿/橙三种颜色的三带通滤光片（Vysis，Inc.，Downers Grove，IL）。

3. 高压光源，100W 汞灯（Carl Zeiss，Inc.，Thornwood，NY）。

3. 方法

3.1 血细胞分离

1. 抽取约 30mL 静脉血置于肝素钠抗凝采血管中（见注解 2）。

2. 吸取 15mL 血样加到 50mL 聚酯锥形管中，并加 15mL PBSE（血和 PB-SE 的终体积比为 1∶1）。30mL 血样分到 2 个 50mL 聚酯锥形管中。

3. 用消毒的注射器和巴氏吸管将 10～15mL 淋巴细胞分离液加于上述混合液管底，拧紧管盖，1600r/min（200*g*）离心 25min。

4. 小心地将管取出，用真空泵和巴氏吸管吸掉上层（主要成分为血浆和血小板）弃去，留下此层约 1cm。

5. 用 10mL 移液管吸取上面两管的单核细胞层，混合于 50mL 管内，1600r/min（200*g*）离心 10min。

6. 倒掉上清，用 50mL 的 PBSE 重悬细胞沉淀，1200r/min（100*g*）离心 5min。倒掉上清，用与最初血样等体积的 PBSE（30mL，见注解 3）重悬细胞沉淀，涡旋振荡器上振荡以获得均一的细胞悬液。

7. 取 50μL 细胞悬液分装到 5mL 聚酯管中，每管加 50μL 的 0.2%台盼蓝后，将细胞置于血球计数板上计数，用 PBSE/2%FBS 悬浮细胞至终浓度 20×

10^6 个/mL。

3.2 定量磁力微粒去除

1. 将 CD3-生物素和 CD13-生物素按 10^6 个细胞中加 1μg 的浓度混合进行细胞染色。置冰上孵育 20min。

2. 用 PBSE 洗细胞悬液 2 次，在 15mL 聚酯管中用 PBSE/5%FBS 重悬细胞，使细胞终浓度为 10×10^6 个/mL。

3. 加适量洗过的抗生物素磁力微粒（量的计算见本章 2.1.2），置冰上孵育 15～20min，每隔 5min 进行旋转确保微粒和细胞的悬液均一。

4. 将管置于磁场中 5min，用电动吸管小心移去未结合的细胞，置于新的 15mL 聚酯管内。再次进行磁场分离以确保去除所有磁性微粒，将未结合的细胞转移到第三个干净的 15mL 聚酯管内。

5. 离心未结合的细胞，用 10～20mL 的 PBSE 重悬，如上述 3.1 中第 7 步的方法计数去除后细胞。用 PBSE/2%FBS 液重悬细胞，使细胞终浓度为 20×10^6 个/mL。

3.3 细胞表面染色

1. 在每 1×10^6 细胞中加 1μg 的 CD71-FITC（为厂家推荐量一半）和 10μL 的 CD45-PE 稀释液（见本章 2.1.3），置冰上孵育 20min。

2. 用 PBSE/2%FBS 液洗细胞后，用 3%多聚甲醛重悬细胞至终浓度为 10×10^6 个/mL，置冰上孵育 60 min。

3. 用 PBSE/2%FBS 液洗细胞 2 次，然后用 PBSE/2%FBS 液重悬细胞至终浓度 10×10^6 个/mL。

4. 4℃避光保存，以备分选。

3.4 流式细胞分选

1. 调整氩激光到波长 488nm，在 50mW 水平操作。

2. 颜色补偿：25%～30% FITC 信号源于 PE 信号，5% PE 信号来源于 FITC 信号，通过相应的单色或双色荧光染料染色的样品调试得到。

3. 液滴振动频率提升到 30kHz 以生成更多更小的液滴，鞘液压力为 12psi（1psi=6.894 76×10^3 Pa）。

4. 采用双液滴偏离和非同步性进行分选。根据分离和去除后的细胞浓度，用 0.2～2mL PBS/2% FBS 悬浮样本，使得流动速度为 1000～6000 个/s。

5. 前向角光散射作为直线信号被收集，所有的发射荧光用四级十进对数标尺进行收集。设置光散射门以消除碎片和聚集。靶细胞为 $CD45^-$ 和 $CD71^+$ 。

3.5 细胞收集

将一个甲硅烷基化的载玻片置于分选细胞束通路上，以收集需要的细胞。然后使载玻片在空气中完全晾干。干燥的载玻片标本于新鲜的 Carnoy 固定液中固定 2 次，每次 15 min，使细胞黏附在载玻片上的同时可以去除残留的流式分选 Isoton II 液。玻片晾干后 −20℃保存以备 FISH 操作。同样，也可用一无菌的小离心管代替载玻片收集悬液中的细胞。用 PBSE/2%FBS 液洗脱分选的细胞[62]以去除残留的盐，然后制成 20～50μL 的细胞悬液，4℃保存以备 FISH 操作使用（见注解 4）。

3.6 五色 FISH

1. 将标本于室温的 2×SSC 中放置 5min。

2. 将标本在 70%、90%、100%的系列乙醇中各 2min 使细胞 DNA 脱水，空气中完全晾干。

3. 将标本置于 70%甲酰胺/2×SSC 中 20min 以变性细胞 DNA。该变性时间的确定基于 3%多聚甲醛的固定。如果甲醛浓度低于 3%，变性时间应相应减少 5～10min。还应注意：一次变性的标本多于一张，每增加一张标本，变性液的温度将被降低 1℃，因此应将水浴温度相应提高。

4. 在 20min 变性的同时，开始准备五色探针混合液，并在冰上避光保存备用。

5. 迅速将变性好的标本置于 70%、90%和 100%乙醇（均为 −20℃）中脱水各 2 min，空气中完全晾干。

6. 将 5 个探针混合液在 70℃水浴中变性 5min。

7. 将变性好的探针混合液迅速加于玻片上的目标杂交区，盖上 22mm×22mm 盖片，并用橡皮泥封片。

8. 将标本置于 37℃湿盒中杂交过夜（16h）。

9. 次日早晨，将装在有盖染色缸中的约 40mL 的 2×SSC 在水浴中预热至 70℃。

10. 每次只处理一张标本，去掉盖片和橡皮泥，然后在 70℃的 2×SSC 中洗 10s。

11. 立即转入 1×PBD 内 1min。

12. 在 24mm×50mm 盖片上加 18μl DAPI-II 复染液，用纸巾吸去标本表面

多余的 PBD 后将其倒扣于加 DAPI 的盖片上。轻压排除气泡，将标本置于避光玻片盒内，避免过多暴露于光线中。

13. 待 DAPI 复染细胞 10min 后即可在荧光显微镜下观察。分析完毕后，标本置片盒内 4℃保存。

3.7 镜检分析

1. 通过探针标记的特异颜色识别每条待检的染色体，对每个细胞进行分析每种探针显示的 0、1、2、3 或更多信号。尽管我们曾随意选择每一杂交反应 3000 个核进行分析，事实上经过流式细胞分选后每一样本平均仅能获得约 1500 个核供 FISH 分析（见注解 5）。

2. 男胎细胞可通过一个 X 信号（黄色）和一个 Y 信号（蓝色）进行识别（见注解 5）。

3. 计数 3 种直接信号可检测胎儿 13、18、21 三体。判断结果时，3 种信号计数必须注意区分信号和信号分离的情况。由于间期核不同阶段，染色体的浓缩程度不同，大部分 FISH 探针都是由好几个 DNA 片段组成。信号分离可能出现在一条或是两条同源染色体上。一般认为判断为信号分离的标准有两个：①两个信号的大小和亮度都小于另一同源染色体的信号；②两信号间的距离比两个信号的直径小（见注解 6）。

3.8 MACS 细胞的 FISH

对用 MACS 方法从母亲血中富集的细胞进行 FISH 的操作程序有一些改动（见注解 7）。

4. 注释

1. 用多种探针检测非整倍体时，用荧光素检测的抗体可能会影响 FISH 分析。用 FITC 标记的抗体染色细胞内含量丰富的蛋白质（如 γ-珠蛋白）会导致整个细胞核都被荧光覆盖。用发射绿色光谱范围的荧光素标记的探针很难识别，限制了用于 FISH 分析的染色体特异性探针的数量。因此，非常重要的是：在做 FISH 之前应了解 FACS 富集细胞过程中使用了哪些荧光染料。

2. 富集前血液标本的保存温度控制对保持良好的标本质量，这对随后的细胞分离和 FISH 都很重要。若隔夜保存，标本可放室温。过高或过低的温度条件会引起细胞成团或细胞溶解，导致收集细胞失败。在每年夏季的几个月中运送细胞有必要用冰袋。

3. 不管用什么类型试剂、什么浓度分离细胞，尽量将获得的细胞层洗干净很重要，避免细胞质残留或核聚集成团以影响 FISH 分析。

4. 在细胞质中有似是而非的颗粒，使得细胞核看上去被薄雾状物覆盖。探针几乎杂交不上。由于传统的细胞遗传分析实验，细胞的洗脱不彻底、没在严格的温度和湿度条件下进行细胞干燥。为避免这种情况，细胞直接分选到硅化玻片上后，在 37℃恒温板上放 30～60min 晾干，然后用 Carnoy 液固定。用 Carnoy 液固定后，同样要注意温度和湿度问题。当湿度较低或暖气房间（如冬季），同样可能会出现细胞质颗粒样背景问题。为避免这个问题，可在 Carnoy 液固定后，将玻片水平或垂直放在小盒子里维持湿度，缓慢晾干。或者，（用 FACS 或 MACS）收集到的细胞滴片前可以先放到塑料管内洗脱。为防止细胞损失，不进行细胞离心，重悬在小于 100～200μL 的体积中再进行滴片。

5. 胎儿细胞富集方法大约能将收集胎儿细胞的效率提高 100 倍，所以大概能在每 1000 个母血细胞中收集到 1 个胎儿细胞，而这之前是平均 10^5 个母血细胞中能收集到 1 个胎儿细胞。根据采用的细胞分离和富集方法，收集和扫描的细胞总数都将发生改变。我们的研究小组每个标本可分析到 3000 个核。如果在分析 3000 个细胞核后仍没发现 1 个胎儿细胞，我们发现分析更多的细胞也不太有发现胎儿细胞的可能。

6. 在分析的同时，每位观察者应将每个核的判断记录在表格中。如在临床细胞遗传学分析一样，在玻片上按从左到右、从上到下的方式进行系统的细胞分析。熟练的观察者能在 2～3h 内在一张用三种探针杂交的玻片上分析 3000 个核，在用 5 种探针杂交的玻片上记数同样的细胞核数则需 3～5h。在传统的细胞遗传学产前诊断中，确诊胎儿非整倍体需要发现多个克隆。但如果是用胎儿细胞分析，只要在收集到的胎儿细胞中发现一个三倍体细胞，结果与胎儿核型结果一致就能确诊。当然，前提是在杂交效率理想的条件下，所有或大部分细胞核都有信号。

7. 对 MACS 收集到的细胞若不用多聚甲醛固定或用 1%～2%的低浓度固定，FISH 较容易成功。MACS 收集到的细胞应在相差显微镜下评估。如果细胞核灰色而扁平，用 80℃烤炉（非甲酰胺）变性 1～3min 即可。若用多聚甲醛固定，变性时间应相应延长。如果杂交无信号或信号弱，则需要用蛋白酶 K 或胃蛋白酶进行前处理。

（吴　畏　陈　艳 译，刘青杰 校）

参考文献

1. Bianchi, D. W. (1999) Fetal cells in the maternal circulation: Feasibility for prenatal diagnosis. *Brit. J. Hemat.* **105,** 574–583.
2. Hahn, S., Sant, R., and Holzgreve, W. (1998) Fetal cells in maternal blood: current and

future perspectives. *Mol. Hum. Reprod.* **4,** 515–521.
3. Wachtel, S., Shulman, L., and Sammons, D. (2001) Fetal cells in maternal blood. *Clin. Genet.* **59,** 74–79.
4. Haddow, J. E. (1998) Antenatal screening for Down's syndrome: Where are we and where next? *Lancet* **351,** 336–337.
5. Gekas, J., Gondry, J., Mazur, S., et al. (1999) Informed consent to serum screening for Down syndrome: Are women given adequate information? *Prenat. Diagn.* **19,** 1–7.
6. Goel, V., Glazier, R., Holzapfel, S., et al. (1996). Evaluation of the patient's knowledge of maternal serum screening. *Prenat. Diagn.* **16,** 425–430.
7. American College of Obstetricians and Gynecologists. (1996) Maternal serum screening. ACOG Technical Bulletin number 228. Washington DC: ACOG.
8. Haddow, J. E., Palomaki, G. E., Knight, G. J., et al. (1998). Screening of maternal serum for fetal Down's syndrome in the first trimester. *N. Engl. J. Med.* **338,** 955–961.
9. Pergament, E. (2000) The application of fluorescence *in situ* hybridization to prenatal diagnosis. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* **12,** 73–76
10. DeLaCruz, F., Shifrin, H., Elias, S., et al. (1995) Prenatal diagnosis by use of fetal cells isolated from maternal blood. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **173,** 1354–1355.
11. DeLaCruz, F., Shifrin, H., Elias, S., et al. (1998) Low false-positive rate of aneuploidy detection using fetal cells isolated from maternal blood. *Fetal Diagn. Ther.* **13,** 380.
12. AL-Mufti, R., Hambley, H., Farsaneh, F., et al. (1999). Investigation of maternal blood enriched for fetal cells: role in screening and diagnosis of fetal trisomies. *Am. J. Med. Genet.* **85,** 66–75.
13. Elias, S., Price, J., Dockter, M., et al. (1992) First trimester prenatal diagnosis of trisomy 21 in fetal cells from maternal blood. *Lancet* **340,** 1033.
14. Bianchi, D. W., Mahr, A., Zickwolf, G. K., et al. (1992) Detection of fetal cells with 47,XY,+21 karyotype in maternal peripheral blood. *Hum. Genet.* **90,** 368–370.
15. Ganshirt-Ahlert, D., Borjesson-Stoll, R. M., Dohr, A., et al. (1993) Detection of fetal trisomies 21 and 18 from maternal blood using triple gradient and magnetic cell sorting. *Am. J. Reprod. Immunol.* **30,** 194–201.
16. Cacheux, V., Milesi-Fluet, C., Tachdjian, G., et al. (1992) Detection of 47, XYY trophoblast fetal cells in maternal blood by fluorescent *in situ* hybridization after using immunomagnetic lymphocyte depletion and flow cytometry sorting. *Fetal Diagn. Ther.* **7,** 190–194.
17. Pezzolo, A., Santi, F., Pistoia, V., et al. (1997) Prenatal diagnosis of triploidy using fetal cells in maternal circulation. *Prenat. Diagn.* **17,** 389.
18. Thompson, J. S. and Thompson, M. W. (editors) Clinical cytogenetics: general principles and autosomal abnormalities. *Genetics in Medicine.* 5th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1986. pp. 201–229.
19. Bischoff, F. Z., Lewis, D. E., Nguyen, D. D., et al. (1998) Prenatal diagnosis with use of fetal cells isolated from maternal blood: five-color fluorescent *in situ* hybridization analysis on flow-sorted cells for chromosomes X, Y, 13, 18, and 21. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **179,** 203–209.
20. Bischoff, F. Z., Lewis, D. E., Simpson, J. L., et al. (1999) Isolating fetal cells from maternal blood: Strategies to increase sensitivity for fetal aneuploid detection. *Am. J. Hum. Genet.* **65,** A173.
21. Bischoff, F. Z., Lewis, D. E., Simpson, J. L., et al. (1995) Detection of low-grade mosaicism in fetal cells isolated from maternal blood. *Prenat. Diagn.* **15,** 1182–1184
22. Rodriguez de Alba, M., Gonzalez-Gonzalez, M. C., Palomino, P., and Ramos, C. (2000) Prenatal diagnosis on fetal cells from maternal peripheral blood in cases of confined placental mosaicism. *Prenat. Diagn.* **20,** 264–265.

23. Wang, J. Y., Zhen, D. K., Zilberstein, M. E., Falco, V. M., and Bianchi, D. W. (2000) Non-invasive exclusion of fetal aneuploidy in an at-risk couple with a balanced translocation. *Mol. Hum. Reprod.* **6,** 103–106.
24. Thomas, M. R., Tutschek, B., Frost, A., et al., (1995) The time of appearance and disappearance of fetal DNA from the maternal circulation. *Prenat. Diagn.* **15,** 641–646.
25. Lo, Y. M. D., Corbetta, N., Chamberlain, P. F., et al., (1997) Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. *Lancet* **350,** 264–265.
26. Liou, J. D., Pao, C. C., and Hor, J. J. (1993) Fetal cells in the maternal circulation during the first trimester in pregnancies. *Hum. Genet.* **92,** 309–311.
27. Hamada, H., Arinami, T., Kubo, T., et al. (1993) Fetal nucleated cells in maternal peripheral blood: frequency and relationship to gestational age. *Hum. Genet.* **91,** 427–432.
28. Lim, T. H., Tan, A. S., and Goh, V. H. (2001) Relationship between gestational age and frequency of fetal trophoblasts and nucleated erythrocytes in maternal peripheral blood. *Prenat. Diagn.* **21,** 14–21.
29. Rodriguez De Alba, M., Palomino, P., Gonzalez-Gonzalez, C., et al. (2001) Prenatal diagnosis on fetal cells from maternal blood: practical comparative evaluation of the first and second trimesters. *Prenat. Diagn.* **21,** 165–70.
30. Ciaranfi, A., Curchod, A., and Odartchenko, N. (1977) Postpartum survival of fetal lymphocytes in the maternal blood. *Schweiz. Med. Wochenschr.* **107,** 134–138.
31. Covone, A. E., Johnson, P. M., and Mutton, D. (1984) Trophoblast cells in peripheral blood of pregnant women. *Lancet* **II,** 841–843.
32. Reading, J. P., Huffman, J. L., Wu, J. C., et al. (1995) Nucleated erythrocytes in maternal blood: quantity and quality of fetal cells in enriched populations. *Hum. Reprod.* **10,** 2510–2515
33. Schindler, A. M., Graf, E., and Martin-Du-Pan, R. (1972) Prenatal diagnosis of fetal lymphocytes in the maternal blood. *Obstet. Gynecol.* **40,** 340–346.
34. Shroder, J. and de la Chapelle, A. (1972) Fetal lymphocytes in maternal blood. *Blood* **39,** 153–162.
35. Mueller, U. W., Hawes, C. S., Wright, A. E., et al. (1990) Isolation of fetal trophoblast cells from peripheral blood of pregnant women. *Lancet* **336,** 197–200.
36. Durrant, L., McDowall, K., Holmes, R, and Liu, D. (1996) Non-invasive prenatal diagnosis by isolation of both trophoblasts and fetal nucleated red blood cells from the peripheral blood of pregnant women. *Br. J. Obstet. Gynaecol.* **103,** 219–222
37. Hawes, C. S., Suskin, H. A., Petropoulos, A., et al. (1994) A morphologic study of trophoblast isolated from the peripheral blood of pregnant women. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **170,** 1297–1300.
38. Hsieh, T. T., Pao, C. C., Hor, J. J., et al. (1993) Presence of fetal cells in maternal circulation after delivery. *Hum. Genet.* **92,** 204–205.
39. Bianchi, D. W., Zickwolf, G. K., Weil, G. J., et al. (1996) Male fetal progenitor cells persist in maternal blood for as long as 27 years post partum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93,** 705–708.
40. Bianchi, D. W., Zickwolf, G. K., Yih, M. C., et al. (1993) Erythroid -specific antibodies enhance detection of fetal nucleated erythrocytes in maternal blood. *Prenat. Diagn.* **13,** 293–300
41. Troeger, C., Zhong, X. Y., Burgemeister, R., Minderer, S., Tercanli, S., Holzgreve, W., and Hahn, S. (1999) Approximately half of the erythroblasts in maternal blood are of fetal origin. *Mol. Hum. Reprod.* **5,** 1162–1165.
42. Hall, J. M. and Williams, S. J. (1992) Isolation and purification of $CD34^{++}$ fetal cells from maternal blood. *Am. J. Hum. Genet.* **51,** A257.
43. Bianchi, D. W., Williams, J. M., Sullivan, L. M., et al. (1997) PCR quantitation of fetal

cells in maternal blood in normal and aneuploid pregnancies. *Am. J. Hum. Genet.* **61,** 822–829.
44. Simpson, J. L. and Elias, S. (1995) Isolating fetal cells in the maternal circulation. *Hum. Reprod. Update* **1,** 409–418
45. Holzgreve, W., Ghezzi, F., DiNaro, E., et al. (1998) Feto-maternal cell traffic is disturbed in preeclampsia. *Obstet. Gynecol.* **91,** 669–672.
46. Al-Mufti, R., Hambley, H., Albaiges, G., Lees, C., and Nicolaides, K. H. (2000) Increased fetal erythroblasts in women who subsequently develop pre-eclampsia. *Hum. Reprod.* **15,** 1624–1628.
47. Simchen, M. J., Barkai, G., Lusky, A., and Guetta, E. (2001) Fetal hemoglobin-expressing nucleated red blood cell frequencies in pregnancies with intrauterine growth restriction. *Prenat. Diagn.* **21,** 31–35.
48. Medearis, A. L., Hensleigh, P. A., Parks, D. R., et al. (1984) Detection of fetal erythrocytes in maternal blood post partum with the fluorescence-activated cell sorter. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **148,** 290–295.
49. Nelson, J. L., Furst, D. E., Maloney, S., et al. (1998b) Microchimerism and HLA-compatible relationships of pregnancy in scleroderma. *Lancet* **351,** 559–562.
50. Bianchi, D. W. (2000) Fetal cells in the mother: from genetic diagnosis to diseases associated with fetal cell microchimerism. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **92,** 103–108.
51. Elias, S., Lewis, D. E., Simpson, J. L., et al. (1996) Isolation of fetal nucleated red blood cells from maternal blood: persistence of cells from prior pregnancy is unlikely to lead to false positive results. *J. Soc. Gynecol. Invest.* **3,** 359A.
52. Jansen, M. W., Brandenburg, H., Wildschut, H. I., et al. (1997) The effect of chorionic villus sampling on the number of fetal cells isolated from maternal blood and on maternal serum alpha-fetoprotein levels. *Prenat. Diagn.* **17,** 953–959.
53. Samura, O., Sekizawa, A., Zhen, D. K., Falco, V. M., and Bianchi, D. W. (2000) Comparison of fetal cell recovery from maternal blood using a high-density gradient for the initial separation step: 1.090 versus 1.119 g/mL. *Prenat. Diagn.* **20,** 281–286.
54. Sekizawa, A., Farina, A., Zhen, D. K., et al. (1999) Improvement of fetal cell recovery from maternal blood: suitable density gradient for FACS separation. *Fetal Diagn. Ther.* **14,** 229–233.
55. Troeger, C., Holzgreve, W., and Hahn, S. (1999) A comparison of different density gradients and antibodies for enrichment of fetal erythroblasts by MACS. *Prenat. Diagn.* **19,** 521–526.
56. Ganshirt-Ahlert, D., Burschyk, M., Garritsen, H. S. P., et al. (1992) Magnetic cell sorting and the transferrin receptor as potential means of prenatal diagnosis from maternal blood. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **166,** 1350–1355.
57. Busch, J., Huber, P., Pfluger, E., et al. (1994) Enrichment of retal cells from maternal blood by high gradient magnetic cell sorting (double MACS) for PCR-based genetic analysis. *Prenat. Diagn.* **14,** 1129–1140.
58. Steele, C. D., Wapner, R. J., Smith, J. B., et al. (1996) Prenatal diagnosis using fetal cells isolated from maternal blood: a review. *Clin. Obstet. Gynecol.* **39,** 801–813.
59. Wachtel, S. S., Sammons, D., Manley, M., et al. (1996) Fetal cells in maternal blood: recovery by charge flow separation. *Hum. Genet.* **98,** 162–166.
60. Price, J. O., Elias, S., Wachtel, S. S., et al. (1991) Prenatal diagnosis using fetal cells from maternal blood by multi-parameter flow cytometry. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **165,** 1731–1737.
61. Sohda, S., Arinami, T., Hamada, H., Nakauchi, H., Hamaguchi, H., and Kubo, T. (1997) The proportion of fetal nucleated red blood cells in maternal blood: estimation by FACS

analysis. *Prenat. Diagn.* **17,** 743–752.

62. Lewis, D. E., Schober, W., Murrell, S., et al. (1996) Rare event selection of fetal nucleated erythrocytes in maternal blood by flow cytometry. *Cytometry* **23,** 218–227.
63. Wang, J. Y., Zhen, D. K., Falco, V. M., et al. (2000) Fetal nucleated erythrocyte recovery: fluorescence activated cell sorting-based positive selection using anti-gamma globin versus magnetic activated cell sorting using anti-CD45 depletion and anti-gamma globin positive selection. *Cytometry* **39,** 224–230.
64. Zheng, Y. L., DeMaria, M. A., Zhen, D. K., et al. (1995) Flow sorting of fetal erythroblasts using intracytoplasmic anti-fetal hemoglobin: Preliminary observations on maternal samples. *Prenat. Diagn.* **15,** 897–905.
65. Serlachius, M., Von Koskull, H., Wessman, M., and Schroder, J. (2000) The use of transferrin for enrichment of fetal cells from maternal blood. *Prenat. Diagn.* **20,** 407–410.
66. DeMaria, M. A., Zheng, Y. L., Zhen, D. K., et al. (1996) Improved fetal nucleated erythrocyte sorting purity using intracellular antifetal hemoglobin and Hoechst 33342. *Cytometry* **25,** 37–45.
67. Latham, S. E., Suskin, H. A., Petropoulos, A. et al. (1996) A monoclonal antibody to human placental lactogen hormone facilities isolation of fetal cells from maternal in a model system. *Prenat. Diagn.* **16,** 813–821.
68. Hengstschlager, M. and Bernaschek, G. (1997) Fetal cells in the peripheral blood of pregnant women express thymidine kinase: a new marker for detection. *FEBS. Lett.* **404,** 299–302.
69. Zheng, Y. L., Zhen, D. K., DeMaria, M. A., et al. (1997) Search for the optimal fetal cell antibody: results of immunophenotyping studies using flow cytometry. *Hum. Genet.* **100,** 35–42.
70. Valerio, D., Aiello, R., and Altieri, V. (1997) Isolation of fetal erythroid cells from maternal blood based on expression of erythropoietin receptors. *Mol. Hum. Reprod.* **3,** 451–455.
71. Bigbee, W. L. and Grant, S. G. (1994) Use of allele-specific glycophorin A antibodies to enumerate fetal erythroid cells in maternal circulation. *Ann. NY. Acad. Sci.* **731,** 128–132.
72. Murrell-Bussell, S., Nguyen, D., Schober, W. D., et al. (1998) Optimized fixation and storage conditions for FISH analysis of single-cell suspensions. *J. Histochem. Cytochem.* **46,** 971–974.
73. Tanke, H. J., Oosterwijk, J. C., Mesker, W. E., et al. (1996) Detection of 'rare event' fetal erythroblasts in maternal blood using automated microscopy. *Early. Hum. Dev.* **47** Suppl, S89–S93.
74. Oosterwijk, J. C., Knepfle, C. F., Mesker, W. E., et al. (1998) Strategies for rare-event detection: an approach for automated fetal cell detection in maternal blood. *Am. J. Hum. Genet.* **63,** 1783–1792.
75. Bischoff, F. Z., Marquez-Do, D., Nguyen, D. D., et al. (2000) Semi-automated screening of nucleated red blood cells for prenatal diagnosis using fetal cells in maternal blood. *J. Soc. Gynecol. Investig.* **7 Suppl,** 180A.
76. Zheng, Y. L. Carter, N. P., Price, C. M., et al. (1993) Prenatal diagnosis from maternal blood: Simultaneous immunophenotyping and FISH of fetal nucleated erythrocytes isolated by negative magnetic cell sorting. *J. Med. Genet.* **30,** 1051–1056.
77. Zheng, Y. L., Zhen, D. K., Farina, A., et al. (1999) Fetal cell identifiers: results of microscope slide-based immunocytochemical studies as a function of gestational age and abnormality. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **180,** 1234–1239.
78. Oosterwijk, J. C., Mesker, W. E., and Ouwerkerk, M. C. (1996) Detection of fetal erythroblasts in maternal blood by one-step gradient enrichment and immunocytochemical recognition. *Early. Hum. Dev.* **47 (suppl),** 595–597.

79. Mesker, W. E., Ouwerkerk-van Velzen, M. C., Oosterwijk, J. C., et al. (1998) Two-colour immunocytochemical staining of gamma (gamma) and epsilon (epsilon) type haemoglobin in fetal red cells. *Prenat. Diagn.* **18,** 1131–1137.
80. Oosterwijk, J. C., Mesker, W. E., Ouwerkerk-van Velzen, M. C., et al. (1998) Fetal cell detection in maternal blood: a study in 236 samples using erythroblast morphology, DAB and HbF staining, and FISH analysis. *Cytometry* **32,** 178–185.
81. Oosterwijk, J. C., Mesker, W. E., Ouwerkerk-van Velzen, M. C., et al. (1998) Development of a preparation and staining method for fetal erythroblasts in maternal blood:simultaneous immunocytochemical staining and FISH analysis. *Cytometry* **32,** 170–177.
82. Mavrou, A., Colialexi, A., Tsangaris, G. T., et al. (1998) Fetal cells in maternal blood: isolation by magnetic cell sorting and confirmation by immunophenotyping and FISH. *In Vivo* **12,** 195–200.
83. Oosterwijk, J. C., Mesker, W. E., Ouwerkerkerk-vanVelzen, M. C., et al. (1998) Development of a preparation and staining method for fetal erythroblasts in maternal blood: Simultaneous immunocytochemical staining and FISH analysis. *Cytometry* **32,** 170–177.

第 18 章　荧光原位杂交在非整倍体植入前诊断中的应用

Yury Verlinsky，Jeanine Cieslak，Anver Kuliev

1. 引言

植入前遗传诊断（PGD）作为预防遗传性疾病的一种主要的新方法，可避免产前诊断和终止妊娠的可能性[1,2]。针对遗传异常的高危人群，植入前遗传诊断通过检测卵细胞或胚胎的遗传组成，选择正常的胚胎植入，而不像产前诊断是直接检测胎儿的遗传组成，存在检测结果异常必须终止妊娠的风险。尽管 PGD 最初是针对预期存在遗传异常的病例[3,4]，而最近研究认为，PGD 还适合于散在发生的情况，如染色体异常所致流产及不育。

迄今为止，全世界已进行了 3000 多个 PGD 周期，临床妊娠达 700 多例，已有 600 多个正常婴儿出生[5]。其中至少有 3/4 的 PGD 周期是用荧光原位杂交（FISH）分析年龄相关的非整倍体，有关的内容在 *Atlas of Preimplantation Genetic Diagnosis*[6]一书中详细介绍，本章仅做简要概括。

1.1　PGD 途径

目前 PGD 主要采用两种途径：一种是取胚胎的卵裂球分析；另一种是取成熟卵母细胞伸出的第一极体（PB1）或受精后排出的第二极体（PB2）分析；卵裂球活检于 6～8 细胞期进行，可检测父源和母源性的遗传异常[3,6]；而第一极体和第二极体分析只能用于母源性遗传异常的检测[4,6]。这两种途径各有利弊，实际采用哪种途径应视具体临床情况而定。例如，对于父源性的显性遗传和易位，以及性别选择和 HLA 配型都选择卵裂球活检的方案，尽管卵裂球活检后胚胎细胞数目减少有可能影响胚胎的发育。另一方面，在卵母细胞成熟和受精过程中自然分别排出的第一极体和第二极体应不存在影响胚胎发育的问题，但不会提供有关性别和父源性突变。PB1 和 PB2 遗传分析对检测常染色体隐性遗传及母源性显性突变和染色体易位非常有意义；对 X 连锁遗传性疾病的诊断同样适用，避免卵裂球活检确定性别后可能存在的 50％受累的男性胚胎的弃用；另外，因 90％的染色体错误源于母系生殖细胞的减数分裂，故极体分析对染色体非整倍体诊断具有特殊的价值。这一途径也对卵裂阶段胚胎高嵌合率的分析很重要，胚胎

高嵌合率是目前用卵裂球 PGD 进行染色体疾患分析的主要技术局限。

1.2 植入前 FISH 诊断

目前与年龄相关非整倍体的 PGD 多采用商业化特异性探针（如 Vysis 公司提供的探针）进行的 FISH 分析。1991 年，FISH 首次应用于 PGD，利用 X 或 Y 染色体特异 DNA 探针进行性别选择[7]。由于单用 X 或 Y 探针进行诊断有可能因杂交失败造成性别判断错误，采用不同颜色分别标记 X、Y 探针做双色 FISH 同时检测 X 和 Y 染色体[8]。在双色 FISH 的基础上，后来又加上判断染色体倍数的 18 号着丝粒特异性探针，提高了检测的准确性[9,10]。随后 FISH 分析发展到可同时检测 5 对常染色体，包括 18、13、16、21、22 号染色体[11,12]。最近，采用第二轮杂交的方法，可分析十几条染色体[12,13]。

据统计，迄今全世界用 FISH 方法进行了 2000 多个临床周期，提高了 IVF 预后患者的妊娠率[5]。其中卵裂球 FISH 分析和极体 FISH 分析各约占一半，使得正常妊娠及已出生的正常婴儿共有数百个。对选择的异常胚胎和 FISH 分析后出生婴儿的确证性随访研究证明用 FISH 进行 PGD 的可靠性，以下将做详细介绍。图 1 显示的是正常和异常 PB1、PB2 和卵裂球 FISH 的图像。

1.2.1 卵裂球的 FISH 分析

大量研究已经证实了用卵裂球 FISH 技术检测非整倍体的可靠性[14～17]。通过比较卵裂阶段胚胎 FISH 结果和形态学异常，及孕妇年龄，发现观察到的染色体异常不在于 FISH 技术的缺陷，而在于胚胎本身的变异[14,15]。卵裂阶段胚胎嵌合率很高，尤其是发育停滞的胚胎[15～17]。胚胎嵌合率平均约 12%，说明卵裂期嵌合现象为常见特征，这是目前 FISH 技术应用于 PGD 非整倍体检测的主要技术局限[18]。但这只部分影响诊断的准确性，因为如果从嵌合型胚胎中发现异常的卵裂球，该胚胎将不会移植。所以临床相关的胚胎嵌合率平均为 5%左右[19]。图 1F 显示了卵裂阶段的嵌合现象。最近研究发现囊胚期胚胎同样存在嵌合现象的问题，尽管有资料表明囊胚期的异常细胞多趋于滋养外胚层。

1.2.2 第一极体的 FISH 分析

PB1 是第一次减数分裂的副产品，在卵母细胞成熟过程当中排出的。首次用 FISH 分析 PB1 是在 1994 年[21～23]。这次实验共取了 130 枚未受精的 M-II 期卵母细胞，同时用 X 和 18 号染色体特异探针杂交的双色 FISH 检测 PB1。结果表明通过 PB1 FISH 可以准确推断相应卵母细胞的染色体组成[21,23]。PB1 中的每条染色体有两个点（信号）相应于每个染色体的两个染色单体（图 1A）。该资料提示：由 PB1 中信号（染色单体）数目可推知相应 M-II 期卵母细胞的信号数目，

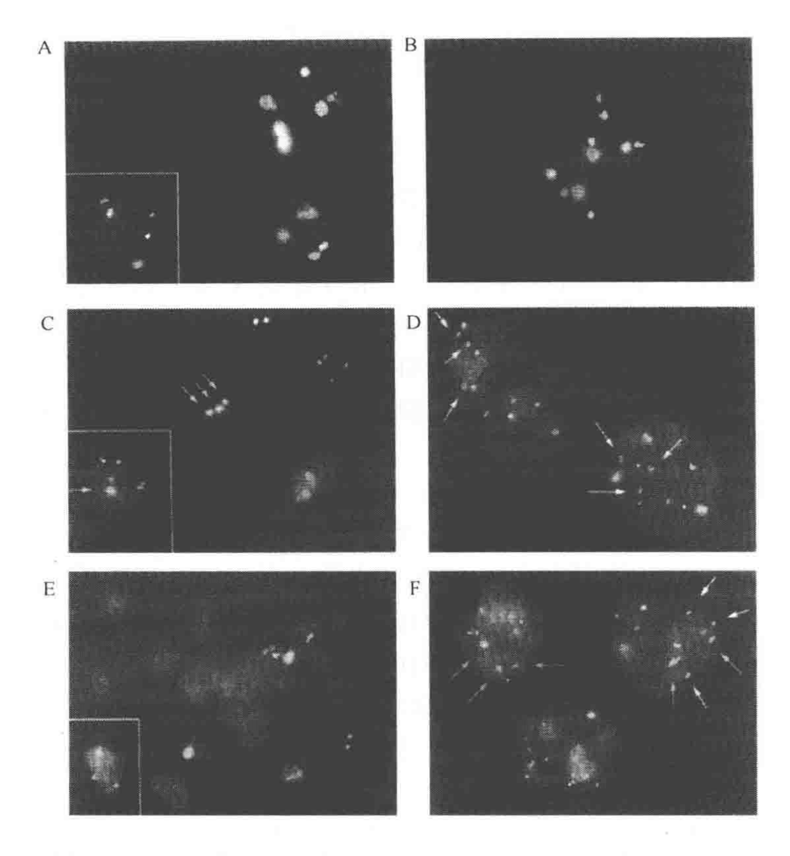


图 1 用 5 种颜色的探针对极体和卵裂球 FISH 分析的正常和异常信号图样。(A) 第一极体中 13、16、18、21 和 22 号染色体的正常信号对（总共 10 个信号)，在第二极体中这 5 条染色体的正常单个信号（共 5 个信号，见左下角图)。(B) 在正常卵裂球中要研究的每对染色体有 2 个信号（总共有 10 个信号)。(C) 在第一极体中 18 号染色体有多余信号（用 3 个箭头所示)，其他染色体信号正常；在第二极体中所有 5 条染色体的信号正常（在第二极体中单个 18 号染色体信号用一个箭头所示)。在第一极体中 18 号染色体多余的信号表明在相应的卵母细胞中缺一条 18 号染色体，然后将这一染色体挤压到第二极体中，导致产生的胚胎为 18 号染色体单体。(D) 在卵裂球和中期染色体分裂相中有 3 个 21 号染色体信号（用 3 个箭头所示）表明胚胎为 21 三体。其他染色体探针信号正常（总共 11 个信号而不是 10 个信号)。(E) 在第二极体中丢失 13 号和 18 号染色体信号（总共 3 个信号而不是预期的 5 个信号，见左下角图)。(F) 源于 (E) 中所示的卵母细胞得到 13 号和 18 号染色体双三体的胚胎。胚胎为 18 三体嵌合体，因为在左边的细胞中有 3 个 18 号染色体信号（3 个箭头所示，该细胞核中只显示 18 号染色体的信号)；右边的细胞中有 5 个 13 号和 18 号染色体信号（5 个箭头所示 13 号和 18 号染色体的信号)，而不是在此 13 号和 18 号染色体双三体的胚胎中预期的 6 个信号。

为卵细胞的遗传选择提供了极好的检测方法。有趣的是，除了检测 PB1 和相应

卵母细胞中信号的正常分布外，也可检测到减数分裂的错误，证实了由 PB1 核型推断相应 M-II 期卵母细胞基因分型的准确性。例如，在 PB1 中发现 4 个 18 号染色体信号，而刚好相应的 M-II 期卵母细胞缺 18 号染色体信号（18 号染色体不分离）。提示由 PB1 检测结果可推知相应卵母细胞的组成，PB1 是从成熟卵母细胞排出而不影响胚胎的发育。研究观察到另一有趣的现象是染色单体异常分离可能在卵母细胞成熟过程中引起染色体非整倍体的原因（见图 1C 中多余染色单体信号的例子）。在 4 个卵母细胞中，都不是预期的两个信号，在 MII 卵母细胞中发现三个信号，而相应的 PB1 中显示单个信号，这与卵细胞的结果相吻合。另一研究小组也得到了相同的结论，证实用 PB1 的 FISH 结果推断植入前胚胎基因分型的诊断性意义[24]。

1.2.3 第二极体的 FISH 分析

第二极体（PB2）是第二次减数分裂的副产品，由受精后的卵母细胞分裂出。1995 年首次提出用 FISH 方法进行 PGD 非整倍体分析有必要同时分析 PB2，因有研究证实仅由 PB1 核型并不能完全推知卵细胞的最终核型[22]。与双倍体 PB1 不同的是，PB2 为单倍体；正常情况下每一染色体在 PB1 上显示双信号，在 PB2 显示单信号（图 1A），当某一染色体在 PB2 上没信号或出现两个信号提示卵细胞第二次减数分裂错误。尽管第一次同时分析 PB1 和 PB2 的研究中总共只分析了 55 个卵细胞中的 19 个，但证实 PB1 和 PB2 都可能发生异常。该研究提示基于 PB1 的 FISH 分析为正常卵细胞，在第二次减数分裂发生染色体不分离仍表现为异常（图 1E）。因此，用 FISH 进行 PGD 非整倍体分析最基本的要求是同时分析 PB1 和 PB2，这样可以确保发现第一次和第二次减数分裂异常。近来，采用 FISH 方法已经分析了 5000 多个卵母细胞，表明 PB1 和 PB2 检测对预测源于相应卵母细胞的胚胎核型的准确性和可靠性。该结果表明 IVF 病例中的高龄母亲，其卵细胞的非整倍体率高达 50%[25~27]。非整倍体源于第一次和第二次减数分裂异常，这与以前认为非整倍体主要源于减数分裂的概念是截然不同的。

2. 材料

2.1 从卵母细胞和胚胎分离后的PB1、PB2和卵裂球的制备

2.1.1 PB1 和 PB2 的制备

1. 显微载玻片（25mm×75mm×1mm）（Fisher Healthcare, Houston, Texas）。

2. 50mL 培养瓶（Fisher Healthcare，Houston，Texas）。

3. 5.75in 的巴斯德吸管。

4. 微量移液器架（Sigma，St. Louis，MO，产品目录号 A-5177）。

5. 金刚石笔（Fisher Healthcare，目录号 13-378）。

6. 铅笔和不褪色标记笔。

7. 用于吹干的橡胶洗耳球。

8. 冰乙酸（开瓶后存放在 5℃条件下以减少吸收空气中的水分）。

9. 甲醇（开瓶后存放在 5℃条件下以减少吸收空气中的水分）。

10. HPLC 级纯水（Mallinckrodt Baker Inc.，Paris，Kentucky）。

11. 解剖显微镜。

12. 配备 10×、20×物镜的倒置显微镜（Olympus CK40，Olympus America Inc.，Melville，NY）。

13. 小型喷灯（Blazer Corporation，New York，NY）。

14. 1～5μL 的毛细吸管（Drummond Scientific，Broomall，Penn.）。

15. 可悬挂液滴的（hanging drop slide）载玻片（Fisher Healthcare，产品目录号 12-560），用金刚石笔在底面中心画出一个圆圈。

2.1.2 卵裂球的制备

所需物品包括 2.1.1 中 1～13 项及以下各项：

1. 25～50μL 的移液管尖（Drummond Scientific）。

2. 35mm×10mm 的有盖培养皿（Falcon）（Fisher Healthcare，产品目录号 08-757-100A）。

3. 牛血清白蛋白（BSA）（Sigma，产品目录号 A-3311）。

4. 柠檬酸钠。

5. 低渗液：6mg/mL BSA 和 1%柠檬酸钠溶于 HPLC 级纯水中，0.2μm 滤器过滤，5℃保存。

2.2 预处理

1. 量筒和刻度移液管。

2. 染色缸[8]。

3. 胃蛋白酶（Vysis Downers Grove，II，商品目录号 30-801265）。

4. 2mol/L 的 HCl 。

5. 氯化镁。

6. PBS（Irvine Scientific，Santa Ana，CA）。

7. 10%中性缓冲的福尔马林（*m*/*V*；4%甲醛）（VWR，Chicago，II，产品

目录号 3239)。

8. 20×SSC 溶液：175.3g 氯化钠、88.2g 柠檬酸钠溶于 1L 的 HPLC 纯水，用 1mol/L HCl 调 pH 至 5.3，0.45μm 滤器过滤，室温可保存 6 个月。

9. 2×SSC 溶液：将 100mL 20×SSC 加入到 900mL 水中，调 pH 至7.0～7.5，过滤后室温可保存 6 个月，工作液每周更换。

10. 1%甲醛缓冲液：将 30mL 10%中性缓冲的福尔马林液、90mL 1×PBS 和 0.54g 氯化镁混合。5℃保存，工作液应每周更换。

11. 0.5mg/mL 胃蛋白酶溶液：25mg 胃蛋白酶溶于 50mL 0.01mol/L HCl 中，应每隔 1～2 周配制新鲜溶液，在 37℃条件下反应。

12. 系列乙醇（70%、85%和 100%）：用 HPLC 纯水稀释无水乙醇。

13. 甲醇。

2.3 探针变性、杂交

1. 玻片电热板（可维持在一定的温度范围，如 68～73℃）。
2. 恒温箱（设定在 37℃）。
3. 微型离心机。
4. 涡旋振荡器。
5. 校准过的温度计（测玻片电热板、恒温箱和水浴的温度）。
6. 20μL、200μL 的微量移液器及合适的无菌枪头。
7. 有盖的玻璃皿（Fisher Healthcare，产品目录号 08-812）。
8. 22mm×30mm 的盖玻片（Corning)(Fisher Healthcare，产品目录号 12-531A)。
9. 微量离心管。
10. 尖头镊子。
11. 封口膜（Fisher Healthcare，产品目录号 13-374-10)。
12. Vysis 专用于非整倍体 PGD 检测直接标记探针系列包括 LSI13：(#32-192018，Spectrum green 标记)，CEP18（#32-131018，Spectrum Aqua)，LSI21（#32-190002，Spectrum Orange)，CEPX、Y（#32-131051，X 染色体标记绿色，Y 染色体标记橙色)；MultiVysion PGT 探针组合包括 X、Y、13、18 和 21 号染色体（#32-131080)；MultiVysion PB 探针组合包括 13、16、18、21 和 22 号染色体（#32-131085)。

2.4 洗脱和复染

1. 氯化钠。
2. 柠檬酸钠。

3. HPLC 级纯水。

4. NP-40（Vysis Grove，产品目录号 32-804818）。

5. 1mol/L 氢氧化钠溶液。

6. 1mol/L 盐酸。

7. 水浴锅（可达 100℃）。

8. pH 计和参考标准。

9. Vectashield 抗淬灭溶液（Vector Labs，产品目录号 H-1000）。

10. DAPI 复染剂（Sigma，产品目录号 D1388）。

11. 0.4×SSC/0.3% NP-40：将 20mL 的 20×SSC（pH 5.3）、977mL 的 HPLC 级纯水和 3mL NP-40 混合，充分混匀至 NP-40 完全溶解，用 NaOH 调 pH 至 7.0～7.5，加水定容至 1L，用 0.2μm 的滤器过滤，未用的溶液可在室温保存 6 个月。

12. 2×SSC/0.1% NP-40：将 100mL 20×SSC（pH 5.3）、899mL 的 HPLC 级纯水和 1mL NP-40 混合，充分混匀至 NP-40 完全溶解，用 NaOH 调 pH 至 7.0～7.5，加水定容至 1L，用 0.2μm 的滤器过滤，未用的溶液可在室温保存 6 个月，每天更换工作液。

13. 0.7×SSC/0.3% NP-40：将 35mL 的 20×SSC（pH 5.3）、962mL 的 HPLC 级纯水和 3mL NP-40 混合，充分混匀至 NP-40 完全溶解，用 NaOH 调 pH 至 7.0～7.5，加水定容至 1L。

14. DAPI 储存液：用 HPLC 级纯水制备浓度为 1mg/mL 的 DAPI 储存液。

15. DAPI 工作液（0.5μg/mL）：50μL DAPI 储存液溶于 100mL 的 HPLC 级纯水，－20℃保存备用。

16. DAPI/抗淬灭混合液：DAPI 工作液与 Vectashield 抗淬灭溶液等比混合，－20℃保存备用。

2.5 信号评估

1. 荧光显微镜（Microphot FXA-Nikon）。

2. 所有荧光素的单通道滤光片（Chroma Tech.）：DAPI（蓝色）、FITC（绿色）、TRITC（红色）、AQUA（浅绿色）、F15（金色）和 F6（蓝色）。

3. 双通道滤光片：FITC /TRITC（红色和绿色）、Aqua/Blue 和三通道滤光片 DAPI /FITC /TRITC（蓝色、红色和绿色）。

4. 图像设备：装有 P400 Kodak Ektacgrome 胶卷的 35mm 照相机或 CCD 摄像头、滤光片轮和装有图像分析软件的电脑（Quips Imaging Workstation，Applied Imaging，Santa Clara，CA）。

5. 荧光显微镜专用油（Cargille Laboratories，Ins，Cedar Grove，NJ，产品目录号 16212）。

3. 方法

3.1 用于 FISH 分析的 PB1、PB2 和卵裂球（从卵母细胞和胚胎分离后）的制备

3.1.1 PB1、PB2 标本的制备

1. 在 50mL 培养瓶准备新鲜固定液（甲醇：冰乙酸＝3：1），在冰柜中保存备用。

2. 将毛细吸管在小型喷灯的火焰上拉出内径约 50μm 的尖，内径太大可能会丢失极体。

3. 加几滴固定液再处理预先处理过的玻片以清除可能存在的油脂或灰尘，用无尘纸吸干。

4. 用巴斯德吸管吸少许 HPLC 纯水加到可悬挂液滴的载玻片上。

5. 从卵母细胞或受精卵成功取出极体后，可以用相差显微镜（10×、20×物镜）来观察极体，极体存在于显微操作仪上的平皿里的 20μL 培养液滴里（液滴上面用矿物油覆盖）[6]。

6. 极体定位好后，用拉好的毛细吸管吸取少量水，以确定液体进出吸管的通畅。

7. 在吸入少量水后，将极体轻轻吸入毛细吸管移向有水的可悬挂液滴载玻片上，从毛细吸管中轻轻吹出释放极体，直到在玻片中心的圆圈中看到极体。勿让极体固定和贴到可悬挂液滴载玻片的玻璃表面。

8. 在水中漂洗片刻后，用毛细吸管重新吸入极体。极体周围的油通常可以被水洗掉。将极体移向一张干净的载玻片，轻轻吹出含极体的水滴将极体释放。

9. 当水分部分蒸发后，极体开始涨大，变扁平贴到玻片表面。在水分完全蒸发完之前用同一毛细吸管滴一滴固定液在极体上，使染色质分散开。

10. 在固定液完全干掉前，再滴一滴固定液固定，必要时可重复几次，直到细胞质完全溶解，仔细注意观察此过程，应尽量将细胞质去除干净（见注释 1 和 5）。

11. 用金刚石笔在染色质周围画圈定位，注意不能太重，以免玻璃碎屑的影响，再用力在圆圈周围的玻片背面画另一圆圈，以便轻易找到圆圈和分析时定位染色质的位置。

12. 将玻片做好标记，包括患者姓名、卵母细胞编号以及合适的信息，如染

色质块数目。

13. 再加数滴固定液到玻片上，用洗耳球吹干。

14. 玻片可在室温放置过夜后或立即进行杂交，如果立即杂交，则推荐进行预处理。可在移植胚胎比较合理的时间范围内得到很好的结果。

15. 用不褪色标记笔在玻片的背面画出极体染色体质所在，以便确定加探针的位置。

3.1.2 卵裂球标本的准备

1. 在 50mL 培养瓶准备新鲜固定液（甲醇：冰乙酸=3：1)，在冰柜中保存备用。

2. 在一 35mm×10mm 的有盖培养皿底部刻一圆圈便于在此区域找卵裂球，在皿内加 3mL 低渗液。

3. 将 25～50μL 毛细吸管在小型喷灯的火焰上拉出内径约 70μm 的尖毛细吸管。

4. 在毛细吸管吸入少量的低渗液。

5. 在解剖显微镜下定位在培养液微滴内的卵裂球，再次确认制成的毛细吸管的内径比卵裂球大，可以用来吸取卵裂球；然后用它轻轻地吸取卵裂球，将卵裂球移到低渗液皿内。

6. 低渗 3～5min 后，将卵裂球吸到管内移到有少许低渗液的玻片上。

7. 在倒置显微镜下持续观察卵裂球直到几乎全干。在低渗液全干形成结晶之前在卵裂球上滴上一滴固定液。持续观察细胞，在全干前滴一滴新固定液。如此重复几次，直到细胞质裂解，留下细胞核。细胞质去除是否完全直接影响杂交(见注释 1)。

8. 用金刚石笔标记卵裂球的位置以便于杂交后的定位。

9. 在玻片的磨砂端注明合适的信息，再滴数滴固定液，用洗耳球吹干。

10. 玻片可以进行预处理。在加探针前，用不褪色标记笔在玻片的背面标记卵裂球核的确切位置，以确定加探针的区域。

3.2 标本预处理

1. 在 37℃的 2×SSC（pH 为 7.0～7.5）中洗 10min。

2. 在 1%甲醛中室温条件下固定 5min。

3. 室温条件下在 1×PBS（pH 为 7.0～7.5）中洗 5min。

4. 在 37℃的溶于 0.01mol/L HCl 的胃蛋白酶溶液中处理 5min。

5. 室温条件下在 1×PBS（pH 为 7.0～7.5）中洗 5min。

6. 取出玻片甩掉液体，将背面残留的 PBS 擦去。

7. 室温条件下将玻片在系列乙醇（70%、85%和 100%）中进行脱水各 1min，气干以备杂交。

8. 对需要重复杂交的标本，在预处理前去掉盖玻片，将玻片置于甲醇溶液中 5min，确保染色质固定于玻片上。

3.3 探针制备、杂交及洗脱

3.3.1 探针混合物

1. 三色探针混合：先将盛探针的三个离心管离心，然后用涡旋振荡器振荡理想的探针及 LSI 探针杂交缓冲液 10s。配 10μL 的探针杂交液，也就是 13、18 和 21 号染色体探针各取 1μL，加到盛有 7μL LSI 探针杂交缓冲液的微量离心管中，振荡混匀、离心。

2. 仅一个染色体的探针，则探针混液组成为 1μL 探针、2μL HPLC 级纯水和 7μL 杂交缓冲液。对于 CEPX 和 CEPY 探针混合物，将探针和 CEP 杂交缓冲液振荡并离心。10μL CEPX 和 CEPY 探针混合物工作液组成：1μL CEPX 和 CEPY 的探针混合物、2μL HPLC 级纯水和 7μL CEP 杂交缓冲液。

3. MultiVysion 的 5 色探针混合物是可以直接使用。用前先离心，振荡混匀。所有的探针混合物工作液都可以 −20℃保存几个月（在厂家提供的有效期内）。

3.3.2 杂交程序

1. 杂交前，先用金刚石笔将 22mm×30mm 的盖玻片切成 8mm×8mm 的小块，放在有盖的玻璃培养皿内备用。

2. 封口膜剪成约 22mm×22mm 大小，放在皿内备用。

3. 准备杂交湿盒：用消毒过的水浸湿纸巾后放入一玻璃皿内，再放一玻片架，加盖后放于 37℃温箱预温备用。

4. 从 −20℃取出要杂交的探针混合物工作液，离心 10s 后振荡混匀。

5. 用微量移液器将 2μL 探针混合物工作液加于玻片上标记好的染色质区域后，迅速用镊子将 8mm×8mm 盖玻片盖上，注意不要有气泡而影响杂交。若出现气泡，用镊子轻压盖玻片将气泡赶出。

6. 用橡皮泥或封口膜将盖玻片封口。用封口膜时要注意压下盖片周围，以确保封口膜都粘在玻片上（见注释 2）。

7. 将玻片置于 69℃的玻片电热板上 8min，使探针和标本 DNA 同时变性。然后将玻片标本迅速移到 37℃温箱预热的湿盒中进行杂交（见注释 3 和 4）。

3.3.3 洗脱步骤

以下是我们实验室常用的两种洗脱步骤，无需甲酰胺且省时。

3.3.3.1 快速洗脱程序 I

该洗脱程序适合 1～3 种颜色的探针混合物和 MultiVysion PGT（13、18、21、X 和 Y 染色体）。

1. 将装有 0.4×SSC/0.3% NP-40（pH 7.4）溶液的染色缸放入 73℃水浴中预热，在对标本洗脱之前用校准过的温度计检查缸内的温度，溶液温度应为(73±1)℃。

2. 准备一缸 2×SSC/0.1% NP-40（pH 7.4）溶液，放置于室温下备用。

3. 揭掉盖玻片后立即放入 0.4×SSC/0.3% NP-40（pH 7.4）中，当所有的标本（同一染缸最多放 4 张玻片）放入后洗脱 5min。

4. 将标本移入装有 2×SSC/0.1% NP-40（pH 7.4）液的染色缸中室温洗脱 1min。

5. 从洗脱液中取出标本于 HPLC 级纯水中浸泡一下，将标本垂直立于暗处（如抽屉中）纸巾上晾干。

3.3.3.2 快速洗脱程序 II

该洗脱程序适用于 MultiVysion PB（极体）探针组合，包括 13、16、18、21 和 22 号染色体探针。

1. 将装有 0.7×SSC/0.3% NP-40（pH 7.4）溶液的染色缸放入 73℃水浴中预热，在对标本洗脱之前用校准过的温度计检查缸内的温度，溶液温度应为(73±1)℃。

2. 准备一缸 2×SSC/0.1% NP-40（pH 7.4）溶液，置于室温条件下备用。

3. 揭掉盖玻片后立即放入 0.7×SSC/0.3% NP-40（pH 7.4）中，当所有的标本（同一染缸最多放 4 张玻片）放入后洗脱 7min。

4. 将标本移入装有 2×SSC/0.1% NP-40（pH 7.4）溶液的染色缸中室温洗脱 1min。

5. 从洗脱液中取出标本于 HPLC 级纯水中浸泡一下，将标本垂直立于暗处（如抽屉中）纸巾上晾干。

3.3.4 DAPI 复染

1. 每一玻片加 10μL DAPI/抗淬灭混合液于杂交区，盖上 22mm×30mm 的盖玻片。

2. 用纸巾或吸墨纸使溶液均匀分布和吸去玻片上多余的液体（对于 MultiVysion 5 色探针混合物，配有不含 DAPI 的专用复染液）。

3.4 信号评估

1. 杂交信号在600倍的荧光显微镜油镜下观察。由于荧光信号见光易淬灭，为减少荧光衰减，所有含荧光素的液体操作，包括杂交后标本的处理步骤都应在弱光下进行。对所有不需要光线的步骤（包括杂交温育及洗脱过程）都应避光进行（见注释2）。

2. 荧光显微镜用100W的汞灯激发，尽管制造厂家推荐汞灯的寿命至少有200h，但我们发现使用175h后镜下的杂交信号变弱造成误诊。应有备用汞灯灯泡。

3. MultiVysion PGT的多色探针组合中，X染色体的信号为蓝色，Y为金色，13号染色体为红色，18号为浅绿色，21号为绿色（见注释7和8）。

4. MultiVysion PB极体专用的多色探针组合中，13号染色体的信号为红色，16号为浅绿色，18号为紫蓝色，21号为绿色，22号为金色（图1）（见注释7和8）。

5. 通过与探针标记的荧光素相应的单通道滤光片观察到信号（红、绿、蓝、金、浅绿色及DAPI），双通道或三通道的滤光片只适合于鉴别非特异荧光信号或记数着丝粒探针信号常见的信号渗透，后者探针杂交于α卫星重复序列，信号大而亮（见注释7）。

6. 确定信号数目时，应注意每个信号的大小和亮度，尤其是当两个信号比较接近时。鉴别13、21和22号染色体是用位点特异性探针，其中包含要研究染色体的同源序列和未标记的封闭DNA抑制共同序列。与计数16、18、X和Y染色体着丝粒的探针（与大量的α卫星重复序列杂交）相比，特异序列探针信号为小圆点（见注释6和7）。

7. 对于距离比较近相互搭在一起甚至相互重叠的不同染色体信号，如何与非特异杂交信号进行鉴别，建议同时用单通道和双通道滤光片仔细观察。在图像上，不同颜色的信号重叠部分由于颜色组合可显示黄色或白色（见注释7和8）。当用三色及以上的探针组合时，强烈推荐用图像分析系统进行分析。

8. PB1中每条染色体含两个染色单体，每一染色体应有两个大小相同的信号，一般两信号的间距应大于一个信号的直径（图1中A、C和E）。但如果两个染色单体距离近，信号可能连在一起，像一个荧光小带（图1E中所示的PB1中16号染色体信号），代表两条染色单体（见注释6和9）。

9. PB2中每条染色体含单个染色单体，因此每一检测的染色体呈现一个荧光信号（图1中A、C和E）。

10. 正常情况下，在每个卵裂球核中要研究的染色体信号为两个单点信号（图1中B、D和F）。但由于不同的细胞周期阶段、染色体的浓缩及铺散程度不

同，染色体信号可显示为双点信号。复制后，每一条染色体的信号可显示为距离小于一个信号直径的成对的信号点，或者是两个相互搭在一起的小带，按分析标准这两种情况都应记为一个信号（见注释 7 和 8）。

11. 如果两信号点的大小及亮度都相等，且两者之间的距离大于两个信号的直径，则计为两个独立的信号。但染色质高度浓缩核的两个独立信号间的距离也可能小于两个信号的直径，必须注意考虑这种情况以免误诊。每一个核信号的大小和亮度应与同一玻片上的其他核进行比较，以区分真正的信号和非特异信号。荧光强度弱、小或平面无荧光外观的杂交点不在计数之列（见注释 6 和 7）。

4. 注释

1. 在做杂交前，必须将卵裂球、PB 和 PB2 的染色质完全暴露、无残留的细胞质并牢固在玻片上。因此在加探针之前，极体或卵裂球标本还应进行预处理以保持形态和去掉残留的细胞质。胞质残留是通过核酸复性过程影响杂交的最大因素，可导致非特异荧光信号影响结果判断，这是需要克服的重要问题。染色质暴露的不充分和胞质残留可在杂交后显示非特异的荧光信号，使得信号判断困难甚至无法分析。

2. FISH 涉及的所有操作步骤（包括固定）的标准化和质控监测，对杂交信号的质量和解释是至关重要的。为确保特异性，每一批标本都应有对照淋巴细胞标本同时进行杂交。

3. 依据所用杂交探针种类的不同，杂交时间可从 2h（着丝粒探针或特异序列探针）到 16h（全染色体涂染探针或亚端粒探针）不等。用 MultiVysion 探针组合，不用 DAPI 复染，杂交时间在 3h 内。若杂交时间太长，探针混合物中用 aqua 标记的胎盘 DNA 会使染色质产生很强的背景。建议卵裂球的 MultiVysion 探针杂交时间不超过 2h，极体的 MultiVysion 探针杂交时间不超过 3h。

4. Vysis 公司的 Hybrite 杂交装置可代替玻片电热板和温箱同时对核酸变性和杂交（一次最多可做 12 张玻片）。从变性（69℃、8min）到杂交（37℃、3～16h）都是程序化控制。沿玻片电热板在每个槽中都加几微升的水，以保证潮湿的环境，对过夜杂交尤其重要。在玻片上加探针，盖上盖玻片并用封口膜封片后就可以放入 Hybrite 杂交装置。盖上盖子，启动程序，不要动标本直到杂交过程结束。在启动程序前用玻片温度计监测如融解温度是否准确，来确定功能的正常使用。

5. 如果 PB1 固定效果不好，有胞质残留，探针核酸可能无法接触到固定标本的核酸造成杂交失败。如果形成新的杂交，信号可能会很弱和（或）散成多个点，这种情况多见于过度退化的第一极体。染色质固定不足加上细胞残留物可能导致杂交后的非特异荧光，使得信号判断困难甚至无法分析。

6. 尽管所有条件都按标准控制，但有时一个探针或多个探针的信号会较弥散甚至散成多个点，这样的结果分析起来较复杂。这种情况通常是染色质退化所致。当信号弥散或分离时，一定要同时考虑检测 PB1 和 PB2 的信号质量。

7. 非特异杂交在两个或以上的滤光片下都能看见，位置不变，但通常较弱。当探针荧光信号特别强时，可在其他滤光片下观察到渗透的信号，但信号通常较弱且无立体感。一般出现这种现象的都是信号较强且弥散的 α 卫星重复序列探针。

8. 用适当的单通道或双通道滤光片可以排除强的非特异杂交。如果卵裂球核周胞浆去除干净而没杂交信号，同一玻片上其他核有信号，应考虑卵裂球异常。这种情况并不少见，尤其是当核大小差异明显或核片段化时。

9. 在评价 PB1 荧光信号中，考虑到受精后的移出（如回收后 24h），代表每一个染色单体的信号可能进一步分开，因为染色单体随时间延长而分离。这些预先分离的信号视为正常，信号数较易确定（见图 1A 中 PB1 中的 22 号染色体金色信号以及图 1E 中 PB1 中的 18 号染色体信号）。

10. 用 FISH 技术对卵裂球、PB1、PB2 进行植入前非整倍体诊断具有很高的准确性和可靠性。这已通过对预期异常的全胚胎的确证研究和大约 2000 个 PGD 周期的 500 个以上临床妊娠的随访性细胞遗传学检测结果得以验证[5]。

（吴 畏 译，刘青杰 陈德清 校）

参考文献

1. Verlinsky, Y. and Kuliev, A. M. (eds.) (1993) Preimplantation diagnosis of genetic diseases: A new technique in assisted reproduction. Wiley-Liss, New York.
2. Edwards, R. G. (ed.) (1993) *Preconception and Preimplantation Diagnosis of Genetic Diseases.* Cambridge University Press, Cambridge.
3. Handyside, A. H., Kontogiani, E. H., Hardy, K., and Winston, R. M. L. (1990) Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* **344,** 768–770.
4. Verlinsky, Y., Ginsberg, N., Lifchez, A., et al. (1990) Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis. *Hum. Reprod.* **5,** 826–829.
5. International Working Group on Preimplantation Genetics. (2001) Preimplantation Genetic Diagnosis: Experience of Three Thousand Clinical Cycles. Report of the 11th Annual Meeting of International Working Group on Preimplantation Genetics, in Association with 10th International Congress of Human Genetics, Vienna, May 15, 2001. *Reprod. BioMed. Online* **3** (in press).
6. Verlinsky, Y. and Kuliev, A. (2000) *Atlas of Preimplantation Genetic Diagnosis.* Parthenon, London, N. Y.
7. Griffin, D. K., Handyside, A. H., Penketh, R. J. A., Winston, R. M. L., and Delhanty, J. D. A. (1991) Fluorescent *in-situ* hybridization to interphase nuclei of human preimplantation embryos with X and Y chromosome specific probes. *Hum. Reprod.* **6,** 101–105.

8. Griffin, D. K., Wilton L. J., Handyside, A. H., Winston, R. M. L., and Delhanty, J. D. A. (1992) Dual fluorescent *in-situ* hybridization for the simultaneous detection of X and Y chromosome specific probes for the sexing of human preimplantation embryonic nuclei. *Hum. Genet.* **89,** 18–22.
9. Schrurs, B. M., Winston, R. M. L., and Handyside, A. H. (1993) Preimplantation diagnosis of aneuploidy using fluorescent *in-situ* hybridization: Evaluation using a chromosome 18-specific probe. *Hum. Reprod.* **8,** 296–301.
10. Munne, S., Weier, H. U. G., Stein, J., Grifo, J., and Cohen, J. (1993) A fast and efficient method for simultaneous X and Y *in-situ* hybridization of human blastomeres. *J. Assisted Reprod. Genet.* **10,** 82–90.
11. Munne, S., Lee, A., Rozenwaks, Z., Grifo, J., and Cohen, J. (1993) Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum. Reprod.* **8,** 2185–2191.
12. Munne, S., Magli, M. C., Bahce, M., Fung, J., Legator, M., and Morison, L. (1998) Preimplantation diagnosis of the aneuploidies most commonly found in spontaneous abortions and live births: XY, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22. *Prenat. Diagn.* **18,** 459–1466
13. Bahce, M., Cohen, J., and Munné, S. (1999) Preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy: Were we looking at the wrong chromosomes? *J. Assist. Reprod. Genet.* **16,** 154–159.
14. Munné, S., Alikani, M., Tomkin, G., Grifo, J., and Cohen, J. (1995) Embryo morphology, developmental rates and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil. Steril.* **64,** 382–391.
15. Munné, S., Weier, H. U. G., Grifo, J., and Cohen, J. (1994) Chromosome mosaicism in human embryos. *Biol. Reprod.* **51,** 373–379.
16. Delhanty, J. D. A., Griffin, D. K., and Handyside, A. H. (1993) Detection of aneuploidy and chromosomal mosaicism in human embryos during preimplantation sex determination by fluorescent *in situ* hybridisation (FISH). *Hum. Molec. Genet.* **2,** 1183–1185.
17. Harper, J. C., Coonen, E., Handyside, A. H., Winston, R. M. L., Hopman A. H. N., and Delhanty, J. D. A. (1994) Mosaicism of autosomes and sex chromosomes in morphologically normal monospermic preimplantation human embryos. *Pren. Diagn.* **15,** 41–49.
18. International Working Group on Preimplantation Genetics. (1997) Current Status of Preimplantation Diagnosis. *J. Assist. Reprod. Genet.* **14,** 72–75.
19. International Working Group on Preimplantation Genetics (2001) 10th Anniversary of Preimplantation Genetic Diagnosis. *J. Assist. Reprod. Genet.* **18,** 66–72.
20. Evsikov, S. and Verlinsky, Y. (1998) Mosaicism in inner cell mass of human blastocysts. *Hum. Reprod.* **13,** 3151–3155
21. Dyban, A., Fredine, M., Severova, E., et al. (994) Detection of aneuploidy in human oocytes and corresponding first polar bodies using FISH. *7th International Conference on Early Prenatal Diagnosis.* Jerusalem, Israel, May 22–27 (Abstract #97).
22. Verlinsky, Y., Cieslak, J., Freidine, M., et al. (1995) Pregnancies following pre-conception diagnosis of commom aneuploidies by fluorescent in-situ hybridization. *Hum. Reprod.* **10,** 1923–1927.
23. Dyban, A., Fredine, M., Severova, E., Cieslak, J., and Verlinsky, Y. (1996) Detection of aneuploidy in human oocytes and corresponding first polar bodies by FISH. *J. Assist. Reprod. Genet.* **13,** 72–77.
24. Munné, S., Daily, T., Sultan, K. M., Grifo, J., and Cohen, J. (1995) The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy. *Hum. Reprod.* **10,** 1014–1120.
25. Verlinsky, Y., Cieslak, J., Ivakhnenko, V., Lifchez, A., Strom, C., and Kuliev, A. (1966) Birth of healthy children after preimplantation diagnosis of common aneuploidies by polar body FISH analysis. *Fertil. Steril.* **66,** 126–129.

26. Verlinsky, Y., Cieslak, J., Ivakhnenko, V., Evsikov, S., Strom, C., and Kuliev, A. (1998) Pre-Pregnancy Genetic Testing For Age-Related Aneuploidies by Polar Body Analysis. *Genet. Testing* **1,** 231–235.
27. Verlinsky, Y., Cieslak, J., Ivakhnenko, V., et al. (1999) Prevention of Age-Related Aneuploidies by Polar Body Analysis. *J. Assist. Reprod. Genet.* **16,** 165–235.
28. Verlinsky, Y., Cieslak, and J., Kuliev, A. (2001) High Frequency of Meiosis II Aneuploidies in IVF Patients of Advanced Maternal Age. *Reprod. Technol.* **10,** (in press).

第 19 章　微小缺失综合征的特征及其诊断

Stuart Schwartz，Michael D. Graf

1. 引言

在 1986 年 Schmickel 第一次对邻近基因综合征（contiguous gene syndrome）进行定义。这些综合征涉及某条染色体上包括多个基因的一段相连 DNA 的缺失，也称为微小缺失综合征或片段非整体型（segmental aneusomy）。在临床上识别这些综合征依据独特的身体、行为或智力上的特征，常包括许多以孟德尔方式遗传的独特个体特征（如平脑畸形、心脏缺陷等）。相对于其他类型的细胞遗传学异常，微小缺失综合征因荧光原位杂交（FISH）技术的应用受益更多。尽管一些异常可以用细胞遗传学方法检测到，FISH 技术能显著提高对这些疾病的识别能力，且能应用在需要证实这些缺失的任何时候（表 1）。

表 1　微小缺失综合征

综合征	表型特征	细胞遗传学定位	FISH 探针
Prader-Willi 综合征	张力减退，食欲过盛，肥胖，身材矮小，手脚小，色素沉着不足，智力障碍	15q11-q13	商品化（SNN）
Angelman 综合征	张力减退，小头畸形，共济失调步态，不适宜发笑，抽搐，色素沉着不足，智力障碍	15q11-q13	商品化（D15）
Miller-Dieker 综合征	I 型平脑畸形，异常面容	17q13.3	商品化（D17）
颚心面综合征（22q 缺失）	异常面部，上颚裂，胸腺发育不全，低血钙，心脏缺损	22q11	商品化（TUP）
Langer-Giedion 综合征	多外生骨疣，智力障碍	8q24.1	研究者
AWTA（WAGR）	Aniridia，Wilms 肿瘤，泌尿生殖器发育不良，智力障碍	11p13	研究者
Smith-Magenis 综合征	畸形面部特征，行为异常，自我伤害行为，外周神经病，智力障碍	17p11.2（FLII，TOP3，SHMT1）	商品化

续表

综合征	表型特征	细胞遗传学定位	FISH 探针
Williams 综合征	畸形面部特征，婴儿高血钙，先天心脏病，社交人格，未成年老化皮肤，智力障碍	7q11.23	商品化（ELN）
Rubinstein-Taybi 综合征	畸形面部特征，拇指和第一足趾宽阔，智力障碍	16p13.3	研究者
α地中海贫血和智力障碍综合征（ATR-16）	畸形面部特征，智力障碍，Alpha-Thalassemia	16p13.3	研究者
Aligille 综合征	畸形面部特征，慢性胆汁郁积，脊椎弯曲，肺狭窄	20p11.23-p12.2	研究者
格雷格头-多指-并指综合征	多指，智力障碍，颅骨骨结合	7p13	研究者
骨骼营养不良症遗传性营养不良样表型	矮小结实的体形，异常面容，指（趾）骨过短，抽搐和发育迟缓	2q37	研究者
1p36 缺失综合征	张力减退，发育迟缓和智力障碍，生长异常，颅面畸形和微小心脏畸形	1p36	研究者
Xp22.3 缺失综合征	X 连锁的鱼鳞癣，智力障碍，癫痫症，眼睛白化症和 Kallman 综合征	Xp22.3	研究者
Xp21 综合征	肌营养不良，肾上腺发育不全，甘油激酶缺乏，智力障碍	Xp21	研究者
Saethre-Chotzen 综合征	Saethre-Chotzen 综合征，学习障碍	7p21.1	研究者
Y 染色体综合征	单侧隐睾病，先天性不育	Yq13	商品化（PCR 引物）
范德伍德综合征	唇裂伴随（或不伴随）上颚裂，双侧唇凹陷，牙发育不全	1q32-1q41	研究者
先天再生不良性贫血	红细胞发育不全，还有精神运动障碍，张力减退，巨头畸形	19q13.2	研究者
NF1 微小缺失综合征	神经纤维瘤，早期发作的皮肤神经纤维瘤，面部畸形，学习障碍/智力障碍	17q11.2	研究者
末梢 22q 微小缺失	张力减退，严重语言障碍，轻度面部畸形	22q13-22qter	商品化（D22S39，ARSA）
17p11.2 复制	Charcot-Marie-Tooth 1A 型疾病，发育障碍	17p11.2	商品化（FLII，TOP3，SHMT1）
猫眼综合征	眼组织残缺，肛门闭锁，学习障碍和智力障碍	22q11.2	研究者
双着丝粒（15）	抽搐，孤独症，智力障碍，轻度面部畸形	15q11-15q13	商品化（SNRPN）

2. 常见的微小缺失综合征

2.1 Smith-Magenis 综合征

Smith-Magenis 综合征（SMS）由 17p11.2 缺失所致，估计新生儿发生率为 1/25 000。该缺失造成一致的体征、发育延迟和行为问题。体征包括独特的面容：短头、突出的前额、一字眉、内眦赘皮皱褶、宽鼻梁、耳朵异常和下颌前突。另外，经常具有短指（趾）、外周神经病、低沉嘶哑的声音和疼痛敏感性降低。每个 SMS 病例具有不同程度的智力障碍（MR），经常出现语言障碍。或许最容易识别 SMS 的特征是睡眠干扰（很难躺下入睡）和行为问题。常见的行为问题包括撞头、咬手腕、自身抱合（自我拥抱）、剔甲癖（拔出自己的手指甲或脚趾甲）和 polyembolokilamania（向身体上的孔中插入物体）[1]。

SMS 的关键区域估计含有大约 5Mb 的 DNA，该区域可常被细胞遗传学检测到缺失。然而，一些病例可发生更小的缺失，必须用 FISH 证实这些微小细胞遗传学缺失。

2.2 Miller-Dieker 综合征

Miller-Dieker 综合征（MDS）是一种罕见的邻近基因缺失，由 17p13.3 缺失导致。MDS 的表型包括 I 型平脑畸形、智力障碍、特征型面容（包括突出的前额、双颊凹陷、小头畸形、短鼻且上翻鼻孔、上唇凸起、细唇红缘和小颌骨[2]）。

少数 MDS 病例为常染色体隐性遗传，但绝大多数发生 17p13.3 区域的缺失。研究发现负责该综合征平脑畸形（LS1）的一个基因，而其他可疑基因的缺失可能导致了该综合征的异常面容。17p13.3 区域的缺失可由许多机制导致，包括亲代 17 号染色体的平衡易位或倒位、环状 17 号染色体或新出现的缺失。用常规的细胞遗传学方法可以检测到大约 50%的缺失，但用位于 17p13.3 的 MDS 探针进行 FISH 可以检测或证实 MDS 关键区域是否发生缺失。另外，一些孤立的平脑畸形病例也能用这种探针检测。

2.3 Prader-Willi 综合征和 Angelman 综合征

由 15q11-q13 区域改变导致的 Prader-Willi 综合征（PWS）和 Angelman 综合征（AS）在新生儿中的发生概率均为 1/10 000～1/15 000。PWS 和 AS 的绝大部分病例（70%）是源于该区域的缺失。其他原因如单亲二倍体、印迹突变和

AS 病例中的基因突变在这里不做详细讨论。PWS 和 AS 显示遗传印迹，说明表型是由亲代来源的 15 号染色体异常决定。如果缺失发生在源于母亲的 15 号染色体，将导致 AS，而遗传自父亲的缺失导致 PWS。

这两种综合征的临床表型截然不同。PWS 包括婴儿期的严重张力减退、发育迟缓、性腺发育不足、身材矮小和智力障碍；发生在儿童早期的严重多食症（过度饮食）造成的肥胖可能是最独特的特征之一，尽管也具有易怒、倔强和强迫刻板的行为；尤其在儿童时期还具有典型的面部特征，包括杏仁形眼睛、窄直径双额、窄鼻梁、薄上唇的下翻嘴。AS 的典型特征包括轻度张力减退、早期抽搐、发育迟缓、语言迟缓或无语言、运动失调和严重的智力障碍；典型行为包括周期性不适宜发笑、手扑动、舌头强伸、睡眠异常、多动和攻击性行为；常见的体征包括大宽嘴、缝隙大的牙齿、突出的尖下巴、脊柱侧突、挛缩和色素沉着不足[3]。

高分辨率染色体分析通常可以检测到 PWS/AS 缺失，但需要用 SNRPN 探针进行 FISH 实验证实细胞遗传学分析结果或检测亚显微缺失。然而，FISH 技术无法确定染色体的双亲来源，所以需要进一步的分子分析（甲基化分析或单亲二倍体研究）确定缺失是否导致 PWS 或 AS。

2.4 颚心面综合征和 DiGeorge 综合征

颚心面综合征（VCF）和 DiGeorge 综合征都是由发生在 22q11 的缺失导致。它们在临床上有重叠特征，近来的文献建议在描述这种病情时统称为 22q11 缺失综合征。这可能是最常见的微小缺失综合征，估计新生儿中的发病率为 1/4000。22q11 缺失综合征的临床特征非常多变，但可能包括高鼻音说话方式、学习障碍、低血钙性抽搐、胸腺发育不全导致的 T 细胞异常。22q11 缺失综合征的典型体征包括长的锥形手指、上颚裂、方形鼻根的突出鼻子以及小头畸形。在更严重的病例（DiGeorge 综合征）中，发生第三鳃弓和第四鳃弓异常，导致胸腺发育不全和副甲状腺发育不全。先天性心脏疾病通常与该缺失有关（85％的病例），通常为多种心脏（conotruncal）缺损。因此，当产前诊断中发现特定的结构缺陷后，进行针对 22q 缺失的 FISH 实验进行证实。

只有 20％～30％的 22q11 缺失可以用常规细胞遗传学方法检测到，必须用 FISH 方法来验证缺失。可用于检测该缺失最常见的是商品化 TUPLE1 探针[4]。

2.5 Williams 综合征

Williams 综合征是因 7q11.23 包括弹性蛋白基因的区域缺失所致。Williams 综合征是一种涉及中枢神经系统和血管结缔组织的发育疾病。其体征包括突出的

嘴唇、内眦赘皮皱褶、星型虹膜的蓝眼睛、鼻孔前倾、长人中、肾脏和齿系异常、早熟老化的皮肤。常伴随有心脏缺陷，大多数病例为主动脉上瓣狭窄[5~8]。Williams 综合征的婴儿经常患有腹痛和高血钙症。患病儿童具有喜社交的个性，因为他们常常外向、好说话的和非常友善。患 Williams 综合征的人经常发生中度智力障碍且可能存在行为问题。

该综合征不能用常规或高分辨率染色体分析检测。用弹性蛋白基因的 DNA 探针进行 FISH 实验可以检测到该缺失。

3 比较不常见的微小缺失综合征

3.1 Langer-Giedion 综合征

Langer-Giedion 综合征（毛-鼻-指综合征 II 型-TRPSII）是一种邻近基因综合征，包括至少 2 个常染色体显性疾病（TRPS I 和遗传性多发性外生骨疣）的致病基因（TRPS I 和 EXT I）的缺失。Langer-Giedion 综合征具有上述两种常染色体显性综合征的表型特征，包括发育迟缓/智力障碍、毛发稀少、球状鼻、锥形指骨骺（全部见于 TRPS I）和多发性软骨外生骨疣。定位研究表明发育迟缓/智力障碍是由 TRPS I 基因以外的基因所致。因此，位于 8q24.1 的 TRPS I、EXT I 和 MR 基因的微小缺失导致该综合征的表型[9]。

在许多病例中，可以通过常规或高分辨分析检测到缺失。目前还没有商品化的探针，但黏粒、噬菌体、PAC 和 YAC 探针可用于检测缺失的 FISH 实验，也可用缺失区域内的微卫星标记物进行分析[10]。

3.2 Rubinstein-Taybi 综合征

Rubinstein-Taybi 综合征（RTS）是一种常染色体显性疾病，定位在 16p13.3。一些病例是由于该区域的 RTS 基因缺失所致。Rubinstein-Taybi 综合征具有多种表型特征，包括生长和智力障碍、宽拇指和宽脚趾、身材矮小、特征性面容（鹰钩鼻、突出的小柱、上颌骨发育不全以及下斜的眼睑裂缝）。分子分析表明该综合征是由点突变或染色体重排（包括缺失、易位和倒位）引起 CREB 结合蛋白（CBP）降解所致。CBP 基因编码一种巨大核蛋白，涉及转录调节、染色质重塑和几条不同信号通路的整合[11~13]。

用常规或高分辨率染色体分析通常无法发现该缺失。早期研究用其中含有 CBP 的黏粒 RT1，发现高达 25％的 RTS 病例具有染色体综合征；然而最近的研究提示较低的数据结果（8％～12％）更有可能。Petrij 等的工作显示：应该用一组 5 种黏粒（而不是仅用 RT1）探针来完成 FISH 分析[12]。

3.3 无虹膜联合肾胚细胞瘤

无虹膜联合肾胚细胞瘤（AWTA）也称为肾胚细胞瘤、无虹膜、泌尿生殖器发育异常和迟缓综合征（WAGR），由11号染色体短臂（11p13）缺失所致。发生此缺失的儿童无虹膜（虹膜缺如）和智力障碍。一些发生缺失的XY核型个体出现性别反转，表型为女性。一部分缺失个体也发生肾胚细胞瘤，一种最常见于儿童肿瘤的肾脏肿瘤。由于通常与多种特征有关，发生该缺失的儿童，即使未发现肾胚细胞瘤，也应该监测该肿瘤。在该区域已经确定决定无虹膜（AN2）、肾胚细胞瘤（WT1）和性别反转基因[14]。

通常用常规或高分辨细胞遗传学分析可检测到此种缺失。可以购买到一系列黏粒探针，用于证实该区域缺失的FISH试验[15]。

3.4 α-地中海贫血和智力障碍综合征（ATR16）

α-地中海贫血和智力障碍综合征（ATR16）是一种罕见疾病，由位于短臂端粒区域的16q13.3缺失所致。位于该区域的两种α-血红蛋白基因缺失的个体将成为α-地中海贫血携带者，而其他临近基因的缺失导致轻微畸形面容和智力障碍[16]。如果双亲中的另一位也是携带者，孩子可能患α-地中海贫血或血红蛋白H。最近Pfiefer等的研究发现：编码446个氨基酸蛋白、在脑中高表达的SOX8基因在一个ATR-16病例中发生缺失，该基因是导致ATR16病例发生智力障碍的候选基因[17]。

该综合征最初很少通过高分辨染色体分析检测到，常常是通过病例的表型发现确定，通过FISH或分子分析来证实。

3.5 Alagille综合征

Alagille综合征是一种定位于20p11.23-20p12.2的遗传性疾病。疾病的特征为轻度畸形面容、慢性胆汁淤积（与肝内胆管缺乏有关）、心血管异常、视力异常和轻度骨骼畸形。发现Jagged 1（*JAG1*）基因是Alagille综合征的致病相关基因，该基因编码Notch信号通路中的一种配体，被认为与细胞命运决定有关。已发现的Alagille综合征病例中大约70%是因*JAG1*突变所致，包括蛋白质平截、剪接和错义突变。*JAG1*整个基因发生缺失也会导致Alagille综合征，然而这种情况并不常见，大约只占病例的6%[18,19]。大约95%的Alagille综合征病例有心脏缺陷，绝大多数涉及心脏右侧缺损，缺损程度从轻度外周肺动脉狭窄到严重的法氏四联症。最近的研究发现单独发生心脏缺陷的个体（如法氏四联症）也

存在 *JAG1* 基因突变[20]。

Alagille综合征发生相关的缺失并不常见，但绝大多数缺失可以用常规细胞遗传学或高分辨率染色体分析检测到。商品化的 YAC 和 BAC 重叠群可用于 FISH 分析。

3.6 格雷格头-多指-并指综合征

格雷格头-多指-并指综合征是一种常染色体显性疾病，在有些病例中与 7p13 缺失相关。该综合征主要特征为颅缝早闭和多指（趾）并指（趾）。研究发现是由涉及锌指基因 *GLI3* 的点突变或易位导致。进一步分析指出虽然 *GLI3* 突变可导致格雷格头-多指-并指综合征，该基因的突变也可能导致 Pallister-Hall 综合征或后轴多指 A 型。由 *GLI3* 基因或邻近区域突变导致的格雷格头-多指-并指综合征病例表明：除了已经发现的表型（多指并指、拇指分叉、罕见颅骨形状、髋脱臼和骨龄老化）外，还伴有严重的发育迟缓和智力障碍[21,22]。

绝大多数与该邻近基因有关的缺失都可以用常规细胞遗传学方法检测。用研究者自制的 FISH 探针和商品化的分子标记物都可以进行更详细地分析。

3.7 骨骼营养不良症遗传性骨营养不良样表型

骨骼营养不良症遗传性骨营养不良样表型据报道是一种在 2 号染色体长臂端粒区域（2q37-2qter）微缺失的综合征。特征包括矮小粗壮的体形、异常面容（包括圆脸、毛发稀少、深陷的眼睛、球状鼻和细唇红缘）、指（趾）骨过短、抽搐和发育迟缓。行为发现包括周期性多动和攻击性行为。尽管已经报道了许多病例，目前还未发现可能的候选基因区域[23,24]。

采用常规细胞遗传学分析和高分辨研究对许多病例进行确认和识别。可以购买到几种 YAC 和 BAC 用于对该区域进行更加详细的研究。

3.8 1p36.3 缺失综合征

在过去的几年中，越来越多的报道涉及一种 1p36.3 缺失的微小缺失综合征，在遗传学中的重要性也在增加。这些病例的表型特征包括：张力减退、发育迟缓和智力障碍、生长异常（生长停滞、小头畸形和肥胖）、颅面畸形（巨大的前囟门、突出的前额、深陷的眼睛、扁鼻梁、脸中部发育不全、耳朵不对称、尖下巴、口面裂缝）和轻度心脏畸形[25]。神经发育曲线提示该综合征有严重的学习障碍、张力减退的运动延迟、显著滞后的视觉成熟程度、伴有癫痫的体位不对称[26]。某些情况下，该缺失的病例是因怀疑患有 Prader-Willi 综合征而被发现

的，然而大多数是由于张力减退被发现。Shapira 等研究一组 14 个病例，采用 FISH 和 DNA 多态性分析发现不存在一致的缺失区域，这些病例发生一系列不同长度的缺失[27]。

许多病例是通过常规和高分辨细胞遗传学方法检测到的，因为 1p36 处出现明显的两条深带。因为表型非常广泛，在一个特定亚群的病例中很难用 FISH 寻找某种特异性缺失。然而，据报道用一种亚端粒探针试剂盒检测到几个病例的 1p36.3 的缺失。如上面所提到的，可以用一系列的商品化 BAC 探针进行 FISH 分析研究该区域[27]。

3.9 Xp22.3 缺失

Xp22.3 缺失综合征是一种见于男性的经典邻近基因缺失综合征。它涉及 X 染色体的假常染色体区域几个基因的缺失，每个基因缺失分别导致一种特异的表型。该综合征涉及的基因缺失导致 X 连锁干皮病、智力障碍、癫痫症、眼部白化症和 Kallman 综合征。在一些病例中也包括点状软骨发育不良造成的矮小。病例可能是因为上述的任何一种表型而被发现，随后确定包括几个基因的缺失[28,29]。

该缺失通常可用常规细胞遗传学方法检测出，因为它涉及几 Mb 的 DNA。然而也存在一些较小的缺失，可以用商品化探针进行 FISH 检测 X 连锁鱼鳞癣（STS）或 Kallman 综合征（KAL）[28,29]。

3.10 Xp21 缺失

类似上面提到的 Xp22.3，涉及 Xp21 的邻近基因缺失也见于男性。该邻近基因缺失综合征也涉及几个特定基因的缺失，每个基因缺失导致特异的表型。绝大多数的病例是因为存在杜兴肌营养不良而被发现的男性。然而他们还具有其他的表型特征：Aland 岛眼睛疾患、肾上腺发育不全、甘油激酶缺乏、色素性视网膜炎和鸟氨酸转氨甲酰酶缺乏。实际的表型同样是由确切的断裂点和缺失的基因决定的[30,31]。

虽然一些病例是用常规细胞遗传学方法检测出，但大多数缺失为亚显微缺失，必须用 FISH 探针或微卫星标记物来分析。

3.11 Saethre-Chotzen 综合征

Saethre-Chotzen 综合征是一种比较常见的常染色体显性颅缝早闭疾病。其特征包括短指（或短趾）畸形、软组织并指（趾）、轻微异常面容特征（上睑下

垂、面部不对称和突出耳垂）。分子分析发现 *TWIST* 基因（编码一种基础的螺旋-环-螺旋转录因子）编码区域的突变导致很多该综合征病例的发生。大约 80％的病例是由 *TWIST* 基因异常造成的。Gripp 等发现多达 37％的病例可能出现大片段缺失[32]。不只是 *TWIST* 基因缺失的病例还出现发育迟缓。该基因已定位于 7p21.1[32]。

除易位之外，这不是用常规或高分辨细胞遗传学方法检测的综合征。然而几种商品化 FISH 探针可以确定缺失是否存在和缺失的范围。因为缺失与发育迟缓有关，所以区别潜在的原因是缺失还是突变非常重要。

3.12 范德伍德综合征

范德伍德综合征是一种高度外显的常染色体显性腭裂和唇裂综合征，估计在所有颚裂和唇裂病例中占 2％。该综合征的相关表型特征包括：唇裂伴随或不伴随上颚裂、双侧唇凹陷、牙发育不全。该综合征的病例智力正常，然而，发生缺失的病例存在发育迟缓。该综合征的致病基因还未识别，但已经定位在 1q31-1941 区域的 1.6cM 区域。这也是发生缺失病例的可能相关区域[34,35]。

只有少数该综合征病例被发现发生缺失。发生缺失的病例可以用常规染色体分析检测到。已建立了含有该关键区域的 4.4Mb 的 YAC 重叠群，与商品化 BAC 和 PAC 共同用于更彻底的分析[35]。

3.13 先天再生障碍性贫血

先天再生障碍性贫血是一种罕见的组成性血液疾患，是新生儿或婴儿阶段的单纯红细胞发育不全。它的病因学和发病机制都未知。连锁分析将该疾病定位在 19q13.2 的 4.1cM 区域。对超过 50 例的该综合征病例进行分析发现在一些病例中，小的微小缺失与此种贫血有关。这些病例除红细胞发育不全外，还伴随有巨头畸形、张力减退和精神运动障碍等其他表型。微小缺失病例中的这些附加表型说明这是一种临近基因缺失。分析发生微小缺失的病例将该综合征的关键区域缩小在 1Mb 范围内[36,37]。

早期检测缺失病例是用标准或高分辨方法进行染色体分析。随后，许多研究者为了更好地描述缺失而采用 FISH 方法[37]。

3.14 多发性神经纤维瘤

多发性神经纤维瘤是一种详细描述过的常染色体疾病，病例发生牛奶咖啡样点和神经纤维瘤。被认为是一种表达性变异较大的综合征。分子分析发现多种突

变与该综合征有关。然而，最近的研究指出5%～10%的病例有17q11.2的缺失，其中包括*NF1*基因而不是一个突变。除了神经纤维瘤这种典型特征，病例还有其他特征，如早期发作的皮肤神经纤维瘤、异常面容、学习困难/智力障碍。加上神经纤维瘤的这些特征，我们将该综合征归类为临界基因综合征。与其他微小缺失综合征（Prader-Willi综合征、Angelman综合征、颚心面综合征和Williams综合征）的发现相类似，跨缺失的特定重复/旁系同源片段，导致不平衡减数分裂交换造成的稳定微小缺失[38,39]。

这些缺失不能仅用细胞遗传学分析检测到。可以购买到多种FISH探针，包括详细YAC图谱，以进行更详细的分析[39]。

3.15 22q远端缺失

采用亚端粒探针能够发现之前没有观察到的微小缺失。经许多研究小组详细描述的一种这样的末端缺失是22号染色体长臂亚端粒区域的缺失。发生该缺失的病例存在张力减退、严重语言延迟和轻度异常面容。这些缺失的准确表型特征很难说清楚，因为许多表型结果源于相互易位，而且许多病例中不仅有一个缺失，还有一个重复[40,41]。

这些病例最初只有用22q亚端粒探针（D22S39；ARSA）进行FISH检测。其中几个病例是用VCF探针偶然发现的，尽管VCF探针存在，还是用D22S39探针作为缺失的参考探针来证实这种末梢缺失。

3.16 Y染色体缺失

最近发现的一种微小缺失涉及Y染色体长臂（Yq13）的缺失。这不是一种临近基因缺失，而是一种涉及对男性生育能力很重要的DNA微小缺失。这些男性通常只呈现不育。在Y染色体长臂3个不同区域检测到缺失，包括AZFa、AZFb或AZFc区域。虽然对该缺失频率有许多各种不同的报道，估计在精子生成严重受损的病例中，有2%～4%在该区域发生缺失。较轻微缺陷的男性发生该区域的缺失的频率更低[42,43]。

这些缺失不能用细胞遗传学方法或FISH分析检测到，只能通过对此3个区域的标记物进行PCR分析来发现。

4. 微小重复综合征

理论上，对于许多中间微小缺失，应存在微小重复综合征。然而，在绝大多数病例中并非如此。微小重复可能发生，但临床表型太轻微而不会进行细胞遗传

学分析，或因细胞遗传学上太微细而不能确诊。本综述中将阐述 3 种在文献详细讨论过的微小重复综合征（其中 2 种包含额外染色体）。所有 3 种综合征都已经确立并在文献中得到详细描述。

4.1 17p11.2 重复

17p11.2 重复被认为是 Smith-Magenis 缺失的同源相互重组，是 Smith-Magenis 缺失区域的新出现重复。该重复综合征的临床表型比相同区域缺失的结果轻微。这些病例可能有进行性神经性腓骨肌萎缩 1A 型疾病并伴随发育延迟[44,45]。

这些病例很难用任何标准或高分辨细胞遗传学方法确诊。然而，它们用 FISH 方法可轻易被识别。用与识别 Smith-Magenis 缺失同样的商品化探针（FLII、TOP3、SHMT1）来确定微小重复的存在。另外，该区域详细的基因组图谱已经建立，表明有可能获得其他 FISH 探针和微卫星标记物。

4.2 猫眼综合征

猫眼综合征（CES）是一种具有不同表型的多重异常疾病。这些表型包括：向下倾斜的眼睑裂缝、眼过小、先天性心脏缺陷、泌尿道异常和骨骼异常。所有这些性状可能在只有 1/3 的病例中能同时观察到，然而需要肛门闭锁和眼组织缺损都存在才能进行临床确诊。大约 1/3 的病例中存在轻度到中度的智力障碍。描述该综合征的细胞遗传学特征为存在一条额外由 22 号染色体衍生的、双随体的双着丝粒染色体。

额外的标记染色体很容易用常规细胞遗传学方法检测出来。然而，不是所有 22 号衍生的双着丝粒染色体都与猫眼综合征表型有关。位于 22q11.2 的该综合征的关键区域必须存在。对该区域的研究很多，许多商品化探针可以用于证实其存在。需要注意的是 VCF 探针（如 TUPLE1）位于该区域的远着丝粒端，不适于描述 CES 综合征。

4.3 双着丝粒（15）综合征

15 号双着丝粒染色体，更多的称谓为 inv dup（15）[倒位重复（15）]，也是一条额外的双着丝粒染色体，是细胞遗传学分析中最常见的额外结构异常染色体。该综合征有多种表型，只有轻度异常面容最常见。该综合征大多数与抽搐、孤独症和智力障碍有关。与上面提到的综合征（CES）类似，15 号染色体为双随体的双着丝粒染色体，涉及 15q 上至少 4 个不同区域的断裂。异常表型被认为

只有在 15q 上 Prader-Willi/Angelman 综合征关键区域存在的病例中出现。断裂点在该关键区域近着丝粒端的病例呈现正常表型（除非发生单亲二倍体）[48,49]。

这种标记染色体同样常规用标准细胞遗传学分析来确证。然而，缺少 PWS/AS 关键区域的病例无任何表型。该区域的存在无法用细胞遗传学分析确定，必须用 FISH 检测，而且必须使用用于诊断 Prader-Willi 综合征缺失的探针（如 SNRPN）。有许多商品化和非商品化的探针可用于该研究[49]。

（陈　艳 译，刘青杰 校）

参考文献

1. Juyal R. C., Figuera, F. L., Hauge, F. L., Elsea, S. H., Lupski, J. R., Greenberg, F., et al. (1996) Molecular analyses of 17p11.2 deletions in 62 Smith-Magenis syndrome patients. *Am. J. Hum. Genet.* **58,** 998–1007.
2. Chong S. S., Pack, S. D., Roschke, A. V., Tanigami, A., Carrozzo, R., Smith, A. C., et al. (1997) A revision of the lissencephaly and Miller-Dieker syndrome critical regions in chromosome 17p13.3. *Hum. Mol. Genet.* **6,** 147–155.
3. Cassidy, S. B. and Schwartz, S. (1998) Prader-Willi and Angelman syndromes. Disorders of genomic imprinting. *Medicine (Baltimore)* **77,** 140–151.
4. Funke, B., Edelmann, L., McCain, N., Pandita, R. K., Ferreira, J., Merscher, S., et al. (1999) Der(22) and velo-cardio-facial syndrome/DiGeorge syndrome share a 1.5 Mb region of overlap on chromosome 22q11. *Am. J. Hum. Genet.* **64,** 747–758.
5. Brondum-Nielsen, K., Beck, B., Gyftodimou, J., Horlyk, H., Liljenberg, U., Pedersen, M. B., et al. (1997) Investigation of deletions at 7q11.23 in 44 patients referred for Williams-Beuren syndrome, using FISH and four DNA polymorphisms. *Hum. Genet.* **99,** 56–61.
6. Elcioglu, N., Mackie-Ogilvie, C., Daker, M., and Berry, A. C. (1998) FISH analysis in patients with clinical diagnosis of Williams syndrome. *Acta Paediatr.* **87,** 48–53.
7. Meng, X., Lu, X., Li, Z., Green, E. D., Massa, H., Trask, B. J., et al. (1998) Complete physical map of the common deletion region in Williams syndrome and identification and characterization of three novel genes. *Hum. Genet.* **103,** 590–599.
8. Wu, Y. Q., Sutton, V. R., Nickerson, E., Lupski, J. R., Potocki, L., Korenberg, J. R., et al. (1998) Delineation of the common critical region in Williams syndrome and clinical correlation of growth, heart defects, ethnicity, and parental origin. *Am. J. Med. Genet.* **78,** 82–89.
9. Ludecke, J. J., Schmidt, O., Nardmann, J., von Holtum, D., Meinecke, P., Muenke, M., et al. (1999) Genes and chromosomal breakpoints in the Langer-Giedion syndrome region on human chromosome 8. *Hum. Genet.* **105,** 619–628.
10. Hou, J., Parrish. J., Ludecke, H. J., Sapru, M., Want, Y., Chen, W., et al. (1995) A 4-megabaseYAC contig that spans the Langer-Giedion syndrome region on human chromosome 8q24.1: use in refining the location of the trichorhinophalangeal syndrome and multiple exostoses genes (TRPS1 and EXT1). *Genomics* **29,** 87–97.
11. Taine, L., Goizet, C., Wen, Z. Q., Petrij, F., Bruening, M. H., Ayme, S., et al. (1998) Submicroscopic deletion of chromosome 16p13.3 in patients with Rubinstein-Taybi syndrome. *Am. J. Med. Genet.* **78,** 267–270.
12. Petrij, F., Dauwerse, H. G., Blough, R. I., Giles, R. H., van der Smagt, J. J., Wallerstein, R., et al. (2000) Diagnostic analysis of the Rubinstein-Taybi syndrome: five cosmids should be used for microdeletion detection and low number of protein truncating mutations. *J. Med. Genet.* **37,** 168–176.

13. Bartsch, O., Wagner, A., Hinkel, G. K., Krebs, P., Stumm, M., Schmalenberger, B., et al. (1999) FISH studies in 45 patients with Rubinstein-Taybi syndrome: deletions associated with polysplenia, hypoplastic left heart and death in infancy, *Eur. J. Hum. Genet.* **7,** 748–756.
14. Mannens M., Hoovers J. M., Bleeck-Wagemakers E. M., Redeker E., Bliek J., Overbeeke-Melkert M., et al. (1991) The distal region of 11p13 and associated genetic diseases. *Genomics* **11,** 284–293.
15. Crolla, J. A., Cawdery, J. E., Oley, C. A., Young, I. D., Gray, J., Hantes, J., et al. (1997) A FISH approach to defining the extent and possible clinical significance of deletions at the WAGR locus. *J. Med. Genet.* **34,** 207–212.
16. Lamb J., Harris, P. C., Wilkie, A. O., Wood, W. G., Dauwerse, J. G., and Higgs, D. R. (1993) De novo truncation of chromosome 16p and healing with (TTAGGG)n in the alpha-thalassemia/mental retardation syndrome (ATR-16). *Am. J. Hum. Genet.* **52,** 668–676.
17. Pfeifer, D., Poulat, F., Holinski-Feder, E., Kooy, F., and Scherer, G. (2000) The SOX8 gene is located within 700 kb of the tip of chromosome 16p and is deleted in a patient with ATR-16 syndrome *Genomics* **63,** 108–116.
18. Krantz, I. D., Piccoli, D. A., and Spinner, N. B. (1999) Clinical and molecular genetics of Alagille syndrome. *Curr. Opin. Pediatr.* **11,** 558–564.
19. Krantz, I. D., Colliton, R. P., Genin, A., Rand, E. B., Li, L., Piccoli, et al. (1998) Spectrum and frequency of jagged1 (JAG1) mutations in Alagille syndrome patients and their families. *Am. J. Hum. Genet.* **62,** 1361–1369.
20. Krantz, I. D., Smith, R., Colliton, R. P., Tinkel, H., Zackai, E. H., Piccoli, D. A., et al. (1999) Jagged1 mutations in patients ascertained with isolated congenital heart defects. *Am. J. Hum. Genet.* **84,** 56–60.
21. Kalff-Suske, M., Wild, A., Topp, J., Wessling, M., Jacobsen, E. M., Bornholt, D., et al. (1999) Point mutations throughout the GLI13 gene causing Grieg cephalopolysyndactyly syndrome. *Hum. Mol. Genet.* **8,** 1769–1777.
22. Williams, P. G., Hersh, J. H., Yen, F. F., Barch, M. J., Kleinert, H. E., Kunz, J., et al. (1997) Greig cephalopolysyndactyly syndrome: altered phenotype of a microdeletion syndrome due to the presence of a cytogenetic abnormality. *Clin. Genet.* **52,** 436–441.
23. Phelan, M. C., Rogers, R. C., Clarkson, K. B., Bowyer, F. P., Levine, M. A., Estabrooks, L. L., et al. (1995) Albright hereditary osteodystrophy and del(2) (q37.3) in four unrelated individuals. *Am. J. Hum. Genet.* **58,** 1–7.
24. Wilson, L. C., Leverton, K., Oudi Luttikhuis, M. E., Oley, C. A., Flint, J., Wolstenholme, J., et al. (1995) Brachydactyly and mental retardation: an Albright hereditary osteodystrophy-like syndrome localized to 2q37. *Am. J. Hum. Genet.* **56,** 400–407.
25. Slavotinek, A., Shaffer, L. G., and Shapira, S. K. (1999) Monosomy 1p36. *J. Med. Genet.* **36,** 657–663.
26. Knight-Jones, E., Knight, S., Heussler, H., Regan, R., Flint, J., and Martin, K. (2000) Neurodevelopmental profile of a new dysmorphic syndrome associated with submicroscopic partial deletion of 1p36.3. *Dev. Med. Child. Neurol.* **42,** 201–206.
27. Shapira, S. K., McCaskill, C., Northrup, H., Sikes, A. S., Elder, F. F., Sutton, V. R., et al. (1997) Chromosome 1p36 deletions: the clinical phenotype and molecular characterization of a common newly delineated syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **61,** 642–650.
28. Gohlke, B. C., Haug, K., Funkami, M., Friedl, W., Noeker, M., Rappold, G. A., et al. (2000) Interstitial deletion in Xp22.3 is associated with X linked ichthyosis, mental retardation, and epilepsy. *J. Med. Genet.* **37,** 600–602.
29. Weissortel, R., Strom, T. M., Dorr, H. G., Rauch, A., and Meitinger, T. (1998) Analysis of an interstitial deletion in a patient with Kallmann syndrome, X-linked ichthyosis and mental retardation. *Clin. Genet.* **54,** 45–51.

30. Fries, M. H., Lebo, R. V., Schonberg, S. A., Golabi, M., Seltzer, W. K., Gitelman, S. E., et al. (1993) Mental retardation locus in Xp21 chromosome microdeletion. *Am. J. Hum. Genet.* **46,** 363–368.
31. Stuhrmann, M., Heilbronner, H., Reis, A., Wegner, R. D., Fischer, P., and Schmidtke, J. (1991) Characterisation of a Xp21 microdeletion syndrome in a 2-year-old boy with muscular dystrop, glycerol kinase deficiency and adrenal hypoplasia congenita. *Hum. Genet.* **86,** 414–415.
32. Gripp, K. W., Zackai, E. H., and Stolle, C. A. (2000) Mutations in the human TWIST gene. *Hum. Mutat.* **15,** 150–155.
33. Johnson, D., Horsley, S., Moloney, D. M., Oldridge, M., Twigg, S. R., Walsh, S., et al. (1998) A comprehensive screen for TWIST mutations in patients with craniosynostosis identifies a new microdeletion syndrome of chromosome band 7p21.1. *Am. J. Hum. Genet.* **63,** 1282–1293.
34. Schutte, B. C., Bjork, B. C., Coppage, K. B., Malik, M. I., Gregory, S. G., Scott, D. J., et al. (2000) A preliminary gene map for the Van der Woude Syndrome critical region derived from 900 kb of genomic sequence at 1q32-q41. *Genome Res.* **10,** 81–94.
35. Schutte, B. C., Basart, A. M., Watanabe, Y,. Laffin, J. J., Coppage, K., Bjork, B. C., et al. (1999) Microdeletions at chromosome bands 1q32–q41 as a cause of Van der Woude syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* **84,** 145–150.
36. Tentler, D., Gustavsson, P., Elinder, G., Eklof, O., Gordon, L., Mandel, A., et al. (2000) A microdeletion in 19q13.2 associated with mental retardation, skeletal malformations, and Diamond-Blackfan anaemia suggests a novel contiguous gene syndrome. *J. Med. Genet.* **37,** 128–131.
37. Gustavsson, P., Garelli, E., Draptchinskaia, N., Ball, S., Willig, T. N., Tentler, D., et al. (1998), Identificatin of microdeletions spanning the Diamond-Blackfan anemia locus on 19q13 and evidence for genetic heterogeneity. *Am. J. Hum. Genet.* **63,** 1388–1395.
38. Correa, C. L., Brems, H., Lazaro, C., Marynen, P., and Legius, E. (2000) Unequal Meiotic Crossover: A Frequent Cause of NF1 Microdeletions. *Am. J. Hum. Genet.* **66,** 1969–1974.
39. Riva, P., Corrado, L., Natacci, F., Castorina, P., Wu, B. L., Schneider, G. H., et al. (2000) NF1 microdeletion syndrome: refined FISH characterization of sporadic and familial deletions with locus-specific probes. *Am. J. Hum. Genet.* **66,** 100–109.
40. Praphanphoj, V., Goodman, .K., Thomas, G. H., and Raymond, G. V. (2000) Cryptic subtelomeric translocations in the 22q13 deletion syndrome. *J. Med. Genet.* **37,** 58–61.
41. Precht, K. K., Lese, C. M., Spiro, R. P., Huttenlocher, P. R., Johnston, K. M., Baker, J. C., et al. (1998) Two 22q telomere deletions serendipitously detected by FISH. *J. Med. Genet.* **35,** 939–942.
42. Maurer, B., Gromoll, J., Simoni, M., and Nieschlag, E. (2001) Prevalence of Y chromosome microdeletions in infertile men who consulted a tertiary care medical centre: the Munster experience. *Andrologia* **33,** 27–33
43. Van Landuyt, L., Lissens, W., Stouffs, K., Tournaye, H., Liebaers, I., and Van Steirteghem, A. (2000) Validation of a simple Yq deletion screening programme in an ICSI candidate population. *Mol. Hum. Reprod.* **6,** 291–297.
44. Potocki, L., Chen, K. S., Park, S. S., Osterholm, D. E., Withers, M. A., Kimonis, V., et al. (2000) Molecular mechanism for duplication 17p11.2- the homologous recombination reciprocal of the Smith-Magenis microdeletion. *Eur. J. Hum. Genet.* **8,** 220–235.
45. Thomas, P. K., Marques, W., Jr., Davei, M. B., Sweeney, M. G., King R. H., Bradley J. L., et al. (1997) The phenotypic manifestations of chromosome 17p11.2 duplication. *Brain* **120 (Pt3),** 465–478.
46. Berends, M. J., Tan-Sindhunata, G., Leegte, B., and van Essen, A. J. (2001) Phenotypic

variability of Cat-Eye syndrome. *Genet. Couns.* **12,** 23–34.
47. Johnson, A., Minoshima, S., Asakawa, S., Shimizu, N., Shizuya, H., Roe, B. A., et al. (1999) A 1.5–Mb contig within the cat eye syndrome critical region at human chromosome 22q11.2. *Genomics* 57, 306–309.
48. Wandstrat, A. E., Leana-Cox, J., Jenkins, L., and Schwartz, S. (1998) Molecular cytogenetic evidence for a common breakpoint in the largest inverted duplications of chromosome 15. *Am. J. Hum. Genet.* **62,** 925–936
49. Leana-Cox, J., Jenkins, L., Palmer, C. G., Plattner, R., Sheppard, L., Flejter, W. L., et al. (1994) Molecular cytogenetic analysis of inv dup(15) chromosomes, using probes specific for the Prader-Willi/Angelman syndrome region: clinical implications. *Am. J. Hum. Genet.* **54,** 748–756.

第 20 章　单亲二倍体的分子检测

Wendy P. Robinson

1. 引言

单亲二倍体（UPD）细胞可以有正常的细胞遗传核型但是亲代的贡献不平衡。诊断单亲二倍体需要分析患者和其父母的 DNA 标本基因型，如评估分子多态现象的遗传性。进行此方面的分析最常用微卫星分析，包括多态性短串联重复（STR）位点的 PCR 扩增和聚丙烯酰胺凝胶电泳，根据带型的大小加以区分。有时，单亲二倍体仅仅是“部分”的，也就是仅仅包括染色体的一个区域。这样就要求仔细选择分子标记以确保单亲二倍体区域不被漏检。对于一些染色体来说，父母双方同源基因甲基化的不同也可以用来筛查单亲二倍体。甲基化方法的优势在于无需亲代的 DNA，并且也可以发现其他印记缺陷；缺点在于，单亲二倍体不能和其他原因（如方法本身）所致的异常甲基化区分。

解释这种基因型的结果需要了解单亲二倍体产生的可能机制。一般来说有四种机制：①配子互补：一个带有额外染色体的卵子和丢失同一染色体的精子受精（或反之亦然）；②三体挽救：从三体受精卵中丢失一个额外染色体；③单亲二倍体补偿：一个异常或丢失的染色体被一个拷贝的正常同源染色体取代；④体细胞重组，部分染色体是同源的[1]。在配子互补或三体挽救的病例中，额外染色体拷贝源于减数分裂不分离并且染色体上某些区域的同源序列被传递（单亲异二倍体）或两同等拷贝被传递（单亲同二倍体）。在单亲二倍体补偿和体细胞重组病例中只发现了单亲同二倍体的区域，并且在体细胞重组病例中只包括部分染色体。

单亲同二倍体可以从一个杂合携带的亲代中传递两个拷贝的隐性突变到子代。如果 UPD 发生在发育的早期，就可以是组成性的（出现在所有的细胞中）。体细胞重组也可以导致一个组织类型中某一细胞亚群的 UPD，这是某些肿瘤相关杂合性丢失的发生机制。更常见的担心是 UPD（或者单亲异二倍体或者单亲同二倍体）可导致基因组遗传印迹异常。涉及几个临床综合征[2,3]的遗传印迹就是根据亲代来源不同，一些基因表达的产物不同。

1.1 需要进行单亲二倍体检测的几种情况

1.1.1 遗传印迹基因导致的已知与 UPD 相关的综合征

Prader-Willi 综合征的患者中有母源性 15 号染色体 UPD 的占 20%～25%；Angelman 综合征的患者中有父源性 15 号染色体单 UPD 的大约占 2%[4]。因此，对于有这些综合征临床表现而常见缺失区域 15q11-q13 的 FISH 检测呈阴性的患者有必要进行 UPD 检测。甲基化检测能够识别 UPD、大的缺失或印迹突变的患者，但是却不能区分不同病因[5,6]。对于 FISH 检测 PWS/AS 缺失剩余的玻片，一个可供选择的方法是检测玻片上间期细胞 PWS/AS 探针区域的复制模式[7]。

大约 10% 的 Russell Silver 综合征的患者和母源性 UPD7 相关[8]。对于 UPD7 的检测可以通过微卫星分析也可以选择对 7q32 的 PEG1/MEST 基因亲源性特异甲基化模式来检测[9]。一个部分 UPD 的病例涉及的区域从 7q31 延伸到长臂末端，并且包括已知位于 7q32 区域的遗传印迹基因簇[10]。

母源性 UPD14 与包括身材矮小、肌张力减退、小手、关节过伸及过早青春的综合征相关。这种患者也可以有轻度的发育迟缓但智力通常正常。已经识别出两个部分 UPD14 的患者，这两种患者都包括位于 14q23-q24.2 的 UPD 最小关键区域[11]。当检测 UPD14 时，应该筛查位于这一区域的分子标记。

短暂新生儿期糖尿病有时是由于父源性 UPD6，有报告表明这种 UPD 是仅仅包括 6q24-qter 的部分 UPD[12,13]。根据重复区域判断，可以认为最小关键区域在 D6S308 到 D6S1010 之间[14]。

大约 20%的 Beckwith-Wiedemann 综合征（BWS）患者（UPD11p15.5pat）和 11p15.5 父源性 UPD 有关。在 BWS 患者中，诊断 UPD 很复杂，因为通常是部分 UPD（仅涉及 11p15.5 区域），而且呈嵌合性（仅出现在部分细胞中）[15]。实际上，完全非嵌合性 UPD 被认为是宫内致死性的，因为需要这一区域的母源性表达基因来满足胎盘滋养细胞的功能[16]。

1.1.2 产前检测到的三体嵌合现象

典型的三体导致自发流产，只有在胚胎着床之前丢失一条额外染色体形成二倍体细胞系嵌合现象，才能“挽救”胚胎。典型的情况是在胎盘组织中能够发现存在三体细胞而胎儿组织是正常的二倍体。如果从三体细胞中随机地丢失三条染色体中的一条染色体，那么在衍生的二倍体细胞中预期 UPD 占 1/3。已经报道的仅发生在胎盘的三体嵌合现象中有一个或多个病例伴有包括 2、4、7、9、10、11、14、15、16、17 和 22 号染色体的 UPD[3,17]。如果产前诊断发现 6、7、11、14 或 15 号染色体为三体嵌合现象（6 或 11 号染色体三体很少见），推荐进行

UPD 检测。对于多数其他三体而言，对于 UPD 的后果知之甚少而不能使检测和遗传咨询相关，或者这种三体没有显著影响[3]。

1.1.3 与 UPD 相关的染色体异常

某些染色体异常的风险增加被发现和 UPD 有关。特别是等臂染色体随着 UPD 的风险增加。例如，产前诊断核型为 45，t（15;15）q（10;10）的病例中，大于 10%的病例与 UPD15 有关[18]。非同源的罗伯逊易位风险增加也和 UPD 有关，但是相关风险较低（约占产前确诊病例的 1%）[18]。在易位携带者和小标记染色体患者中筛查 UPD 显示在这些患者中 UPD 增加的风险很小[19,20]。但是，许多染色体的不平衡重排被发现和 UPD 有关，如果表型提示为 UPD 应考虑染色体不平衡重排。

1.1.4 罕见疾病的同源杂合子，仅有一个亲代携带者

UPD 的后果之一是允许从一个亲代携带者传递两个隐性突变到子代[21]。的确，现在很多 UPD 的病例是通过隐性突变的同源杂合子来确定的，包括囊性纤维化病例、甲型血友病、脊肌萎缩症 III、先天性肾上腺增生症、脂蛋白脂肪酶不足、多发性内分泌腺瘤综合征 2A 型和常染色体隐性色盲等疾病[22]。这种情况很少见，但是如果只有一个亲代是隐性突变的携带者就应该考虑到这种可能性。高龄母亲也增加 UPD 发生的可能性。

1.2 基因分型原理

对于父母来源的基因型分析可以通过用任何多态性标记来完成。标记的杂合度越高则多态信息量越高，也就是父母将携带不同的等位基因，这样子代每一个等位基因的来源都可以明确地确定。一般而言，微卫星位点因为易于分析并且信息含量高而被推荐采用。而且由于这样的多态性标记散在于全基因组中，所以很容易确定对于感兴趣的研究区域，哪一个位点更合适。通过应用一个以上的遗传标记验证单亲遗传的存在，排除患者的无效等位基因（微卫星在一条染色体上不能扩增是因为突变会导致引物不能和模板结合）。通过检测其他染色体上双亲的遗传标记也可以除外非亲缘关系。

用跨越多态性重复序列的引物通过 PCR 扩增微卫星位点，不同大小的等位基因通过聚丙烯酰胺凝胶电泳加以分离。根据观察扩增产物的方法不同，用于 PCR 反应的引物也可以用或不用荧光素（或同位素）标记。观察等位基因可以用以下几种方法：①引物放射性标记或把放射性标记的核苷酸加入到反应体系中，接着把聚丙烯酰胺胶曝光到 X 线片上；②未标记引物结合胶银染；③用商业化的试剂盒通过荧光标记引物结合胶上荧光带型检测；④荧光标记引物结合自

动化基因分型仪器的使用（如 ABI PRISM 310）。用毛细管凝胶电泳进行自动化遗传分析结果精确并且可重复，但是这一设备很昂贵并且实验操作依赖于特定的仪器。因为荧光标记引物比未标记的引物更贵，所以当选择使用哪种实验方法时应该考虑到所用引物的数量和跑胶时需要的样品体积。这里介绍的方法是胶银染法，因为这种方法最便宜而且对于仅仅需要中等数量基因分型的实验室，建立这种方法最容易。对于需要高通量分析的实验室，应该考虑使用 ABI310 或 ABI3100 遗传学分析仪（PE Applied Biosystems）或者其他同类的仪器。

2. 材料

2.1 PCR 反应

1. 样品 DNA（20ng/μL）（见注释 1）。

2. 引物：正向和反向引物各 20μmol/L，储存于−20℃（见注释 2）。

3. dNTP 混合物：5mmol/L（每种核苷酸各 1.25mmol/L），储存于−20℃（Pharmacia Biotech）。

4. 10×反应缓冲液：200mmol/L Tris-HCl，pH8.0，100mmol/L KCl，1% Triton X-100，500μg/mL 不含核酸酶的 BSA 和 20mmol/L $MgCl_2$（储存于−20℃）（多数 Taq 酶的供应商提供它们自己的缓冲液混合物，这些混合物可以有所不同）。

5. 耐热的 DNA 聚合酶（嗜热水生菌中提取的 Taq 酶），储液浓度为 5000U/mL（储存于−20℃）。

6. 带有加热盖的热循环仪和薄壁 PCR 管（MJ Research）。

2.2 测序胶

1. 垂直测序胶电泳装置和 3000V 电压装置（如 Bio-Rad 实验室 Sequigen Sequencing Cell 和 Power-Pac 3000）。

2. 40%丙烯酰胺：甲叉丙烯酰胺（27：1）：把 15g 的甲叉丙烯酰胺胶联剂（Bio-Rad）加入到 1L 的 40%的丙烯酰胺溶液中。

3. 5×TBE：54.5g Tris，27.5g 的硼酸，20mL 0.5mol/L EDTA，pH 8.0。加水至 1L。

4. 铺胶的玻璃板（J. T. Baker，Inc）。

5. 10%过硫酸铵（APS）（Gibco），储存于 4℃。

6. *N*，*N*，*N′*，*N′*，-四甲基乙二胺（TEMED），储存于 4℃。

7. 上样染料：尿素 4.2g，1%的溴酚蓝 1mL，0.5mol/L 的 EDTA 100μL，

加去离子水至10mL。分装成1mL至离心管中。

2.3 胶银染

1. 30mL甲醇加10mL冰乙酸，加水至300mL（溶液浓度为10%）。

2. 10%的乙醇。

3. 0.5% 的硝酸。

4. 0.012mol/L的硝酸银溶液（0.6g硝酸银加入300mL水），存于暗处并且使用前约30min配制。

5. 显影剂：59.4g的 Na_2CO_3 加1mL甲醛，加水至2L。

6. 3mm的印迹纸（VWR）。

7. 塑料膜（Superstore）。

8. 耐热玻璃烤盘（Superstore）。

9. 干胶器（Bio-Rad）。

2.4 PCR反应混合物（每个PCR反应20μL）

13μL无菌蒸馏水、2μL 10×缓冲液（不含 $MgCl_2$）、2μL 20mmol/L $MgCl_2$、2μL 10×dNTP储存液、0.2μL正向引物、0.2μL反向引物、0.025μL（终浓度为0.005U）Taq DNA聚合酶和0.5μL（如20ng）稀释的DNA。

3. 方法

3.1 PCR反应实验程序（见注释3）

1. 准备PCR反应混合物：根据DNA样本的数量来确定除了DNA外其他混合物的体积（额外增加一份来确保有足够的PCR反应混合物），将扩增每一个遗传标记并且在每一个PCR反应管内分19.5μL的反应混合物。

2. 在每个管子中加0.5μL的DNA样本。

3. 如果不用带有加热盖的PCR仪，那么就需要在每个管子的顶部加入矿物油来防止液体蒸发。

4. 把管子放在PCR仪中，95℃加热3min变性DNA。

5. 95℃变性40s、55℃引物退火40s、72℃延伸40s，循环30～35次。

6. 72℃终末延伸7min。

7. 把PCR产物和尿素上样缓冲液1∶1混合。

3.2 将 PCR 产物行测序胶（6%胶，21cm×40cm×0.4mm）

1. 配制胶溶液：将 25g 尿素、7.5mL 40%丙烯酰胺：PDA（19：1）、10mL 5×TBE 加入到 250mL 的锥形瓶中。加蒸馏水至 50mL。充分混匀来溶解尿素（见注释 4）。

2. 准备制胶板：把胶板洗干净——确保上面没有灰尘。用硅化玻璃板。根据各个厂家的不同把玻璃板夹在一起并且用胶条封住底部（这一过程根据设备的不同而有所变化）。

3. 加 500μL 10%的过硫酸铵到胶混合液中并且通过滤纸过滤。

4. 取出 10mL 胶溶液加入到一个小烧杯中并且加 10～15μL TEMED。马上将胶倒到板上。几分钟之内胶将聚合到一起，封玻璃板的底部。

5. 封好胶后，加 15μL 的 TEMED 到剩余的胶溶液中并且马上把胶倒到两块胶板之间。仔细插入胶梳子，让胶聚合 2h 至过夜。

6. 取下胶底部的封条。把胶放在电泳槽中确保电极插入的方向正确。将胶槽中灌满 1×TBE（大约 1.5L，根据装置的不同量有所不同）。拔掉胶梳子，用 1×TBE 冲洗上样孔。

7. 把胶预热 60min 直到温度在 50℃左右。

8. 在上样之前再次用加样器冲洗上样孔。在每个孔中加 1～10μL 的产物和上样染料（上样量根据梳子的大小和 PCR 产物的浓度而不同）。根据产物片段大小的不同跑胶时间可以从 30min 到 3h 之间变化。

3.3 银染[23]

1. 用一张 3mm 厚的印迹纸把胶从测序胶装置上取下。胶将粘到滤纸上直到把胶放在甲醇/冰乙酸溶液中才会游离。

2. 切掉胶的底部，这样它将适合放在耐热烤盘中而不至于自己卷曲。在每个步骤中用足够的溶液将胶浸没（大约 300mL）。在染胶过程中尽可能避免用手触摸胶。把胶铺平避免折叠，用戴手套的手轻触胶的角。在每一步的过程中，把胶留在盘中，将旧洗液倒干净（可以用一片塑料板或一张洗过的带有小孔的 X 线片把胶轻轻地拿起来）。

3. 在耐热盘中倒入新鲜配制的 10%甲醇/10%冰乙酸，将胶浸泡 15min，同时轻轻摇动耐热盘使液体循环流动。

4. 在 10%的乙醇溶液中将胶冲洗 5min。

5. 把胶浸在 0.5%的硝酸溶液中恰好 30s。

6. 把胶用水充分冲洗 2 次。

7. 把胶浸在 0.012mol/L 的硝酸银溶液中 15～30min。

8. 快速充分的冲洗胶（用水把胶洗 2 次，任何洗不掉的硝酸银都将产生沉淀，在胶上产生点状沉积。胶不应该在水中浸泡时间过长因为银离子也可以被洗掉）。

9. 把胶浸在 300mL 的显色液中（当液体颜色变为棕色就应更换新液体）。

10. 再用水冲洗一次。

11. 把胶浸在 10%的冰乙酸中至少 2min 来终止反应。

12. 用水冲洗胶。

13. 用干胶器在两块玻璃纸之间干胶或者把胶放在 3mm 的印迹纸上并且用包装纸覆盖顶部。

4. 注释

1. DNA 通常是从 5～10mL 新鲜全血中提取获得。我们通常选择盐析技术而不选择酚。如果仅仅需要提取一定数量的样品而不需要高质量的 DNA 用于其他目的，那么可以制备初级裂解产物。DNA 也可以从其他组织中提取，例如，从简单的口腔冲洗液中提取的 DNA，其数量可以用于多个 PCR 反应[24]。如果仅能得到很少量的 DNA，那么对这些 DNA 的预扩增将很有用。

2. 引物可以通过定制合成（如果需要的量很大）或者可以通过 Research Genetics 公司如 Huntsville 公司购买，AL（http://www.resgen.com/products/HuMPs.php3）。有用的引物可以通过一系列的资源包括 Genome Data Base（http://gdbwww.gdb.org/）等来鉴定。

3. 在标准扩增条件下，2h 内将完成 30 个循环的 DNA 合成。当为一些特殊的引物优化扩增条件时要考虑以下几种因素：①没有扩增或扩增很弱：试着降低几度退火温度，引物浓度加倍，逐步升高镁离子浓度或者增加 3～5 个循环数。②太多非特异扩增：试着降低循环数，调节镁离子浓度，增加退火温度 2～5℃，降低 Taq 酶的浓度。③没有产生引物二聚体扩增产物或者很弱：试着降低引物浓度，增加上面提到的不扩增时采用的步骤。

4. 如果不用银染，那么正常使用 bis（亚甲双丙烯酰胺，*N*，*N*′-methylene-bisacrylamide）而不使用 PDA。PDA 是一种特殊的交联剂，用来减少银染背景的同时可以使胶更结实，这种交联剂对于在银染过程中用手移动胶是必需的。用 bis 的交联剂能够用于银染，但是由于胶很脆，这种交联剂仅能用于小胶。

（袁海昕 译，刘青杰 校）

参考文献

1. Robinson, W. P. (2000) Mechanisms leading to uniparental disomy in humans. *Bioessays* **22,** 452–459.
2. Ledbetter, D. H. and Engel, E. (1995) Uniparental disomy in humans: Development of an imprinting map and its implications for prenatal diagnosis. *Hum. Mol. Genet.* **4,** 1757–1764.
3. Kotzot, D. (1999) Abnormal phenotypes in uniparental disomy (UPD): Fundamental aspects and a critical review with bibliography of UPD other than15. *Am. J. Med. Genet.* **82,** 265–274.
4. Nicholls, R. D., Saitoh, S., and Horsthemke, B. (1998) Imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Trends Genet.* **14,** 194–200.
5. Chotai, K. A. and Payne, S. J. (1998) A rapid, PCR based test for differential molecular diagnosis of Prader- Willi and Angelman syndromes. *J. Med. Genet.* **35,** 472–475.
6. Kubota, T., Das, S., Christian, S. L., Baylin, S. B., Herman, J. G., and Ledbetter, D. H. (1997) Methylation-specific PCR simplifies imprinting analysis. *Nat. Genet.* **16,** 16–17.
7. White, L. M., Rogan, P. K., Nicholls, R. D., Wu, B. L., Korf, B., and Knoll, J. H. (1996) Allele-specific replication of 15q11-q13 loci: a diagnostic test for detection of uniparental disomy. *Am. J. Hum. Genet.* **59,** 423–430.
8. Bernard, L. E., et al. (1999) Clinical and molecular findings in two patients with Russell-Silver syndrome and UPD7: comparison with non-UPD7 cases. *Am. J. Med. Genet.* **87,** 230–236.
9. Kosaki, K., et al. (2000) Diagnosis of maternal uniparental disomy of chromosome 7 with a methylation specific PCR assay. *J. Med. Genet.* **37,** E19.
10. Hannula, K., Lipsanen-Nyman, M., Kontiokari, T., and Kere, J. (2001) A Narrow Segment of Maternal Uniparental Disomy of Chromosome 7q31-qter in Silver-Russell Syndrome Delimits a Candidate Gene Region. *Am. J. Hum. Genet.* **68,** 247–253.
11. Eggermann, T., et al. (2001) Identification of interstitial maternal uniparental disomy (UPD) (14) and complete maternal UPD (20) in a cohort of growth retarded patients. *J. Med. Genet.* **38,** 86–89.
12. Christian, S. L., et al. (1999) Significance of genetic testing for paternal uniparental disomy of chromosome 6 in neonatal diabetes mellitus. *J. Pediatr.* **134,** 42–46.
13. Das, S., et al. (2000) Partial paternal uniparental disomy of chromosome 6 in an infant with neonatal diabetes, macroglossia, and craniofacial abnormalities. *Am. J. Hum. Genet.* **67,** 1586–1591.
14. Cave, H., Polak, M., Drunat, S., Denamur, E., and Czernichow, P. (2000) Refinement of the 6q chromosomal region implicated in transient neonatal diabetes. *Diabetes* **49,** 108–113.
15. Dutly, F., et al. (1998) Seven cases of Wiedmann-Beckwith syndrome, including the first reported case of mosaic paternal isodisomy along the whole chromosome 11. *Am. J. Med. Genet.* **79,** 347–353.
16. Guillemot, F., et al. (1995) Genomic imprinting of Mash2; a mouse gene required for trophoblast development. *Nat. Genet.* **9,** 235–241.
17. Kuchinka, B., et al. (2001) Two cases of confined placental mosaicism for chromosome 4, including one with maternal uniparental disomy. *Prenat. Diagn.* **21,** 36–39.
18. Robinson, W. P., et al. (1996) Cytogenetic and age-dependent risk factors associated with uniparental disomy 15. *Prenat. Diagn.* **16,** 837–844.
19. James, R. S., Temple, I. K., Patch, C., Thompson, E. M., Hassold, T., and Jacobs, P. A. (1994) A systematic search for uniparental disomy in carriers of chromosome translocations. *Eur. J. Hum. Genet.* **2,** 83–95.
20. James, R. S., Temple, I. K., Dennis, N. R., and Crolla, J. A. (1995) A search for uniparen-

tal disomy in carriers of supernumerary marker chromosomes. *Eur. J. Hum. Genet.* **3,** 21–26.

21. Engel, E. (1980) A new genetic concept: uniparental disomy and its potential effect, isodisomy. *Am. J. Med. Genet.* **6,** 137–143.
22. Engel, E. (1999) Invited Editorial: Uniparental disomies in unselected populations. *Am. J. Hum. Genet.* **63,** 962–966.
23. Blum, H., Beier, H., and Gross, H. J. (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA, and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8,** 93–99.
24. Lum, A. and Marchand, L. L. (1998) A simple mouthwash method for obtaining genomic DNA in molecular epidemiological studies. *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention* **7,** 719–224.
25. Zhang, L., Cui, X., Schmitt, K., Hubert, R., Navidi, W., and Arnheim, N. (1992) Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89,** 5847–5851.

第 21 章　生殖病理学中的分子细胞遗传学

Hèlène Bruyère，Evica Rajcan-Separovic，
Dagmar K. Kalousek

1. 引言

过去的 35 年中，常规细胞遗传学分析作为一种重要的辅助诊断，已经为生殖病理学家、遗传学家和内科医生对于自发流产（SA）病因学的建立做出了贡献。然而，10%～30%的流产标本由于培养失败而不能获得细胞遗传学结果。另外，在培养中来源于母体细胞的生长会引起假阴性结果。现在，采用新的分子细胞遗传学手段，几乎所有送检的 SA 病例中，都可有效地获得细胞遗传学信息。

人类生殖中，怀孕失败是常见的，它发生于大约 15%受孕者和 15%～20%已确认怀孕者。怀孕失败主要出现在妊娠的早期。细胞遗传学异常可以反映生殖失败、大于 70%早期流产（怀孕后的前 6 周）、孕 8～15 周的大约 50%怀孕失败，以及 5%～10%死产的主要病因学[1]。几乎所有这些染色体缺陷都是新生的，都是因减数分裂或合子分裂错误或异常受精所致。尽管减数分裂错误可发生于母源或父源配子，但更常见于母源。

怀孕失败的最常见原因是染色体三体。可存在于发育胚胎的所有细胞中，或在某些情况下，于早期合子细胞分裂时，三个染色体拷贝中的一个通过后期延迟或不分离[2]或染色体破坏[3]而丢失。这些事件称为“三体援救”，导致染色体嵌合体，即怀孕时两种细胞系共存，一种二体，另一种三体。三体细胞系可存在于胚胎和胎盘中。这种状况表示广泛的嵌合体，可以特异性地于 10%自发流产中检测到[4]。具有广泛嵌合体存活下来的怀孕者可通过羊水分析进行诊断，但是，有一小部分则是隐秘的[5,6]。如果嵌合体细胞系在胎盘中是有限的，这种状况称为有限的胎盘嵌合体（CPM）[7]。可于孕 10～12 周 1%～2%的绒毛标本中检测到这种状况[8～11]。基于所包含的谱系，可定义为三种类型的 CPM。类型 I：三体细胞系限于滋养层；类型 II：三体细胞系限于绒毛间质；类型 III：两种细胞谱系中都可检测到三体。

宫内胎儿生长迟缓和围产期后果不佳常常与 CPM 有关[12,13]。此外，如检测到 CPM，在胎盘组织为三体的情况下染色体正常的胎儿将有 1/3 具有单亲二体（所获得的一对染色体均来自于同一亲代）的风险。包含特异染色体（如 7，14

和 15）的单亲二体将引起异常胎儿表型（14，15）。

1.1 自发流产

流产定义为过早娩出或孕体成活前从子宫排除。通常认为孕龄为 20 孕周或胎儿重量为 500g 是胎儿成活的低限。

SA 的主要原因是染色体异常。三体见于 26%的怀孕失败者，三倍体和四倍体见于 10%的怀孕失败者，性染色体单体见于 9%的怀孕失败者[1]。大约 10%的病例显示出非整倍体的嵌合体[4]。不平衡结构重排（2%）或双三体（0.6%～1.9%）较少见[16～18]。因此，超过 50%的 SA 存在染色体异常。

X 染色体单体是细胞遗传学异常 SA 中最常见的单条染色体异常。最常见的三体是 16 三体，在所有孕体为三体的病例中 16 三体占 1/3。其他三体的发生频率概括于表 1。

表 1　在孕期前三个月三体自发流产中的三体频率，按照参考文献（1）排列

三体	所占百分数/%
16	31.4
22	11.2
21	10
15	7.1
18	4.6
13	4.6
2	4.6
14	4
7	3.8
8	3.3
4	3.3
9	3
20	2.5
10	2
3	1.3
6	1.3
12	0.8
11	0.4
5	0.4
17	0.4

组织学和形态学检查无助于辨别流产标本的染色体正常或异常[19]。由于这个原因，细胞遗传学检测对于建立 SA 的病因学并提供遗传和生殖咨询是必要的。

1.2 死产

死产定义为孕 20 周或重量超过 500g 后，产时或产前胎儿死亡。这一事件发生于全部出生的 0.4%～4%[20]，而发展中国家该比例较高。在北美，死产约占出生的 1%。死产中染色体异常发生率在非浸软儿中约为 4%[1,22]，在浸软儿中则多于前者 2 倍（9%）[22,23]。

1.3 常规细胞遗传学检测的局限

受孕产物的常规细胞遗传学研究依赖于获得活的组织，建立原代培养，收获中期染色体用以分析。尽管常规细胞遗传学为生殖病理学做出了巨大的贡献，但仍有若干局限性：

1. 以受孕产物的组织进行细胞乙醇学分析的主要问题是获得分裂的细胞。以细胞遗传学检测 SA 组织，其组织细胞培养失败率较高（10%～40%）。孕 34 周后，胎盘生长率较差。浸软死产组织也有超过一半的不能生长。

2. 母体蜕膜的选择性生长可致细胞遗传学诊断为正常女性核型，而并非代表真实的胎儿染色体组。

3. 绒毛间质长期培养时可出现培养的人工产物。

为了避免这些问题，两种近来发展起来的分子细胞遗传学技术——荧光原位杂交（FISH）和比较基因组杂交（CGH），利用未培养的细胞和组织，克服了细胞培养的限制。它们提供了两种可选择的方法用于受孕产物和死产的细胞遗传学分析。

2. 分子细胞遗传学技术

2.1 荧光原位杂交

荧光原位杂交（FISH）可以在中期分裂相和间期细胞核中直接检测目的 DNA 序列的存在（或缺乏）。荧光染料直接或间接标记的探针（一段与目的区域互补的 DNA 序列），在探针 DNA 和标本 DNA 均变性后，与变性后的临床材料进行杂交。然后，通过荧光显微镜观察荧光信号。这种技术目前广泛用于临床细胞遗传学实验室。

2.1.1 应用

当晚期流产的病理学检查显示胎儿有局部畸形，则通常高度怀疑其具有染色体异常，可以通过 FISH 证实。例如，存在后颈部囊状淋巴管瘤则预示着 85%的病例将有细胞遗传学异常，大部分为 X 单体，但也有 21 和 18 三体[24]。因此，对于这种胎儿缺陷来说，应用染色体 13、18、21、X 和 Y 探针可以提供明确的诊断。

当不存在特异性的胎儿缺陷时，可能的染色体异常范围较大。尽管进行全部染色体扫描在理论上是可能的，但采用染色体 13、15、16、18、21、22、X 和 Y 荧光探针可以检测出最常见的常染色体异常以及性染色体非整倍体、三倍体和四倍体。这种方法可潜在地建立超过 80% SA 染色体异常的病因学（表 1）。Weremowicz 等认为，这是一种快速经济有效的方法，使 42%的标本免于继续培养。在另一项研究中，依据超声波所见或尸检结果可选择染色体 13、15、16、18、21、X 和 Y 的 FISH 探针，并用于培养时不生长的标本。这种方法使 30 例标本中有 28 例得出结果，检测出了 46%的非整倍体。2 个 FISH 失败的病例为严重浸软儿。

在病理学检查死产时，用染色体 13、18、21、X 和 Y 探针进行 FISH 可以发现通常于妊娠晚期出现的所有类型的非整倍体[1]。这些探针目前已有商品化的非整倍体检测试剂盒（Cytocell®，Adderbury，UK，Vysis®，Downers Grove，IL）。

2.1.2 局限

与所用 FISH 分析探针相应的特异的染色体拷贝数，提供了有价值的信息。多数情况下，以着丝粒探针进行染色体计数，因为这种探针的信号很大，容易计数。不幸的是，它不能提供所分析染色体的任何结构信息。当出现 3 个信号时，标本假定为三体，然而也可能是三倍体或含有一种不平衡的结构重排。两种或多种探针的同时使用，可以辨别非整倍体和多倍体，这些远比不平衡结构异常更为常见。另外，尽管可于一个或两个实验中使用含有不同荧光染料的几种探针，FISH 仍不能实现全基因组范围内扫描，仅能检测出最常见的三体。

不能可靠地确定少于 10%细胞为异常细胞系的染色体嵌合体的存在。为了增加嵌合体检出的效率，提供临床 FISH 分析的细胞遗传学实验室需要建立 cut-off 值，用于嵌合的非整倍体细胞系的检测[27]。cut-off 值依据组织、探针和假定的观察者而有所不同。

2.2 比较基因组杂交

CGH 技术可以在一次杂交中于全基因组范围内扫描增加或丢失的染色体物质[28]。它包括同时以不同荧光染料标记的待测和参照 DNA，杂交到正常的靶中期染色体上，用数字图像分析系统获得并分析待测和参照 DNA 的荧光强度比值。它将揭示相对于参照 DNA 的待测 DNA 增加或丢失。

2.2.1 应用

最近，Daniely 等（1998）用 CGH 研究了 38 例来自习惯性自发流产夫妇的未确定其病因学的受孕产物。18 例同时进行细胞遗传学和 CGH 分析。15 例的结果一致，仅 CGH 揭示 2 例为部分不平衡；常规细胞遗传学分析揭示 1 例为 16 三体嵌合体，但 CGH 漏检。20 例标本仅用 CGH 进行分析，异常结果者 12 例，该研究不能检测倍体水平[29]。Lomax 等（2000）[30]同时用传统细胞遗传学分析和 CGH 联合流式细胞术分析了 301 例 RSA 或母亲高龄的夫妇自发流产。48 例培养时不生长，但 96%成功地进行了 CGH 分析。2/3 标本为细胞遗传学异常。253 例标本成功地进行了两种方法的分析，235 例显示出结果之间的相关性。14 例中的差异结果是由于母源性污染和四倍体。3 例经细胞遗传学确认为超三倍体，而 CGH 仅显示为非整倍体。1 例显示为 18 号染色体增加，而细胞遗传学显示为四倍体核型并伴有 1 号染色体不平衡重排。这例解释为由于标本错误标记的结果。对于浸软死产的细胞遗传学分析来说，CGH 也显示为一种有价值的技术[31]。CGH 成功地分析了未知核型的 16 例胎儿，包括 5 例浸软儿。10 例死产胎儿在用于常规细胞遗传学分析的组织培养失败后也成功地进行了分析。9 例胎儿结果正常。作者没有对 1 例 17 号染色体端粒区增加的异常 CGH 类型做任何解释，该例未被 17 号染色体长臂端粒探针 FISH 证实。某些情况下，需要几种横跨区域的探针来证实异常 CGH 的结果。

2.2.2 局限

比较基因组杂交可检测染色体不平衡，但不能检测倍体水平上的变化，而后者却与早期自发流产最有关，因为细胞遗传学异常病例中多倍体占 20%，然而，在死产中却非常少见。因此，无论什么时候 CGH 一旦显示出平衡的结果，则应该增加另外一种方法以检测多倍体。

几种可能的选择如下：①流式细胞术，已经广泛用于怀孕细胞中 DNA 含量的定量测定。它操作简便、快速、准确且经济[32]。最近已成功用于 SA 分析[30,31]。②用探针可以对至少两个不同的染色体进行 FISH 分析。③微卫星分

析，可以进一步分析父源的额外单倍体染色体组。这个方法的局限性在于有非整倍体和多倍体都存在时不能确定其倍体水平（如70，XXY，+21）。因为多倍体与复发风险增加无关，所以仅仅基于非整倍体报告的遗传咨询是无效的。CGH可以检测超过10Mb的不平衡重排，并且其分辨率与自发流产培养组织的常规细胞遗传学分析相同（300～350条带）。尽管CGH可能遗漏小的重排，但它却能给出一个更加精确的基因组不平衡范围。然而，确定重排的准确性质需要常规细胞遗传学分析。当不平衡的细胞系小于30%～40%时，CGH检测可能遗漏嵌合体[29,33,34]。所检测的嵌合体的水平可能取决于检测者的经验。CGH不能检测平衡的结构重排。CGH分析端粒区是欠佳的，因为其荧光强度低；而着丝粒和异染色质重复区因其被该技术所必需的未标记的Cot-1 DNA封闭，其效果也不好[33]。

3. 用于分析细胞遗传学技术的组织收集

用于分子细胞遗传学研究的组织可来自于新鲜、冰冻、福尔马林固定和石蜡包埋的标本。标本的典型大小是0.5cm^3。用于FISH研究的标本制备通常包括用来自器官，如胸腺、肺、肾和绒毛的新鲜或冰冻细胞于玻璃载玻片上进行印片。如果用固定或石蜡包埋的组织，则在制作印片之前，需要特殊的程序以使组织脱蜡并再水化[35]。用上述同样的组织可以容易地进行用于比较基因组杂交分析的DNA提取。对于固定或石蜡包埋的组织来说也同样需要特殊的制备程序[36]。对于妊娠前3个月自发流产的研究，病理学家通常主张用绒毛膜或绒毛。为了避免母体污染，这些材料应该进行认真的清理。仅仅当研究嵌合体时，需要收集孕体的三种细胞谱系（滋养层、外胚层间质，以及胚胎/胎儿组织）。常规来说，FISH和CGH都选择绒毛，因为它们是细胞，甚至标本很少，也含有有效量的DNA。

对于细胞遗传学检查来说，仅在孕中期自发流产或死产时，胎儿组织才具有诱惑。然而，妊娠晚期阶段宫内死亡的最常见的原因是胎盘功能异常。因此，胎盘检查应该是后期妊娠失败的细胞遗传学检测的完整部分。当宫内死亡不能解释并且宫内死亡后胎儿仍长期滞留时，这种检查是必要的。胎儿和胎盘组织标本都应进行DNA提取和CGH分析。

在发生晚期宫内死亡时、有严重的宫内生长迟缓并且经产前诊断证实有嵌合体，则预示着最大可能需要进行嵌合体研究。细胞遗传学家需要与临床医生和病理学家进行密切的合作，以得到尽量多的组织。Henderson等也认为，当有限的胎盘嵌合体存在时，胎盘不同位点的三体水平将有所变化。因此，为了证实CPM的存在，病理学家应提供来自几个不同胎盘位点的绒毛。CPM的检测应鼓

励对于特异染色体进行单亲二体的研究，这些特异的染色体在胎盘中是三体，特别是如果该染色体为单亲二体，则将有表型后果。

4. 摘要

本章介绍了两种分子细胞遗传学技术 FISH 和 CGH 以及它们在怀孕失败研究中的应用和局限性。这些分子细胞遗传学技术清楚地显示出有意义地优于传统的细胞遗传学技术，并很可能将成为未来生殖细胞遗传学中主要的细胞遗传学技术。

（曾　瑄 译，王明荣 校）

参考文献

1. Hassold, T. J. and Jacobs, P. A. (1984) Trisomy in man. *Ann. Rev.* **18,** 69–97.
2. Kalousek, D. K. (2000) Pathogenesis of chromosomal mosaicism and its effect on early human development. *Am. J. Med. Genet.* **91,** 39–45.
3. Los, F. J., van Opstal, D., van den Berg, C., et al. (1998) Uniparental disomy with and without confined placental mosaicism: a model for trisomic zygote rescue. *Prenat. Diagn.* **18,** 659–668.
4. Warburton, D., Yu, C. Y., Kline, J., and Stein, Z. (1978) Mosaic autosomal trisomy in cultures from spontaneous abortions. *Am. J. Hum. Genet.* **30,** 609–617.
5. Stavropoulos, D. J., Bick, D., and Kalousek, D. K. (1998) Molecular cytogenetic detection of confined gonadal mosaicism in a conceptus with trisomy 16 placental mosaicism. *Am. J. Hum. Genet.* **63,** 1912–1914.
6. Bruyère, H., Barrett, I. J., Kalousek, D. K., and Robinson, W. P. (1999) Tissue specific involvement in fetal trisomy 16. *Am. J. Hum. Genet.* **65(Suppl.),** pA173.
7. Kalousek, D. K. and Dill, F. J. (1983) Chromosomal mosaicism confined to the placenta in human conceptions. *Science* **221,** 665–667.
8. Ledbetter, D. H., Zachary, J. M., Simpson, J. L., et al. (1992) Cytogenetic results from the U. S. Collaborative Study on CVS. *Prenat. Diagn.* **12,** 317–345.
9. Wang, B. and Rubin, C. J. W. (1993) Mosaicism in chorionic villus sampling: an analysis of incidence and chromosomes involved in 2612 consecutives cases. *Prenat. Diagn.* **13,** 179–190.
10. Hahnemann, J. and Vejerslev, L. (1997) Accuracy of cytogenetic findings on chorionic villus sampling (CVS)-diagnostic consequences of CVS mosaicism and non-mosaic discrepancy in centres contributing to EUCHROMIC 1986–1992. *Prenat. Diagn.* **17,** 801–820.
11. Goldberg, J. and Wohlferd, M. (1997) Incidence and outcome of chromosomal mosaicism found at the time of chorionic villus sampling. *Am. J. Obst. Gyn.* **176,** 1349–1352.
12. Johnson, J., Wapner, R. J., Davies, J. H., and Jackson, L. D. (1990) Mosaicism in chorionic villus sampling: an association with poor perinatal outcome. *Obstet. Gynecol.* **75,** 573–577.
13. Kalousek, D. K., Howard-Peebles, P. N., Olson, S. B., et al. (1991) Confirmation of CVS mosaicism in term placentae and high frequency of intrauterine growth retardation association with confined placental mosaicism *Prenat. Diagn.* **11,** 743–750.

14. Nicholls, R. D. (1993) Genomic imprinting and uniparental disomy in Angelman and Prader-Willi syndromes: a review. *Am. J. Med. Genet.* **46(1),** 16–25.
15. Kotzot, D. (1999) Abnormal phenotype in uniparental disomy (UPD): fundamental aspects and a critical review with bibliography of UPD other than 15. *Am. J. Med. Genet.* **82,** 265–274.
16. Boue, J., Boue, A., and Lazar, P. (1975) Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous human abortions. *Teratology* **12,** 11–26.
17. Kalousek, D. K., Pantzar, T., Tsai, M., and Paradice, B. (1993) Early spontaneous abortion: morphologic and karyotypic findings in 3,912 cases. *Birth Defects* **29,** 53–61.
18. Schluckebier, D., Mountain-Morgan, S., Wall, M., and McGavran, L. (2000) Double chromosomal events in P. O. C. s: not so rare. 2000 *Fall Meeting of the Society for Pediatric Pathology,* Vancouver, BC, Canada, poster 9.
19. van Lijnschoten, G., Arends, J. W., Leffers, P., De La Fuente, A. A., Van Der Looij, H. J., Geraedt, J. P. (1993) The value of histomorphological features of chorionic villi in early spontaneous abortion for the prediction of karyotype. *Histopathology* **22,** 557–563.
20. Singer, D. B. and MacPherson, T. A. (1998) Fetal death and the macerated stillborn fetus in *Texbook of fetal and perinatal pathology* (Wigglesworth, J. S., Singer, D. B., eds.), Blackwell Science, Malden, Mass, pp. 233–249.
21. Feldman, G. B. (1992) Prospective risk of stillbirth. *Obstet. Gynecol.* **79,** 547–553.
22. Angell, R. R., Sandison, A., and Bain, A. D. (1984) Chromosome variation in perinatal mortality: a survey of 500 cases. *J. Med. Genet.* **21,** 39–44.
23. Machin, G. A. (1974) Chromosome abnormality and perinatal death. *Lancet* **1,** 549–551.
24. Kalousek, D. K. (1990) Abortion, in *Pathology of the Human Embryo and Previable Fetus: an Atlas* (Kalousek, D. K., Fitch, N., and Paradice, B., eds.), Springer-Verlag, New York, pp. 31–36.
25. Weremowicz, S., Sandstrom, D. J., Thomas, A., Sandstrom, M. M., and Morton, C. C. (2000) Chromosome analysis on fetal tissues: a revised protocol employing interphase FISH improves success rate. *Am. J. Hum. Genet.* **67(Suppl.),** p159.
26. Sobrino, A. J., Kline, J. K., and Warburton, D. (2000) FISH as an initial screen for aneuploidy in spontaneous abortion specimen. *Am. J. Hum. Genet.* **67(Suppl.),** p. 158.
27. Lomax, B. L., Kalousek, D. K., Kuchinka, B. D., Barrett, I. J., Harrison, K. J., and Safavi, H. (1994) The utilization of interphase cytogenetic analysis for the detection of mosaicism. *Hum. Genet.* **93,** 243–247.
28. Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J. W., Waldman, F., and Pinkel, D. (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* **258,** 818–821.
29. Daniely, M., Aviram-Goldring, A., Barkai, G., and Goldman, B. (1998) Detection of chromosomal aberration in fetuses arising from recurrent spontaneous abortion by comparative genomic hybridization. *Hum. Reprod.* **13,** 805–806.
30. Lomax, B., Tang, S., Separovic, E., et al. (2000) Comparative genomic hybridization in combination with flow cytometry improves results of cytogenetic analysis of spontaneous abortions. *Am. J. Hum. Genet.* **66,** 1516–1521.
31. Christiaens, G. C., Vissers, J., Poddighe, P. J., and de Pater, J. M. (2000) Comparative genomic hybridization for cytogenetic evaluation of stillbirth. *Obstet. Gynecol.* **96,** 281–286.
32. Berezowski, J., Zbieranowski, I., Demers, J., and Murray, D. (1995) DNA ploidy of hydatidiform moles and nonmolar conceptuses: a study using flow and tissue section image cytometry. *Mod. Pathol.* **8,** 775–781.

33. Bryndorf, T., Kirchhoff, M., Rose, H., et al. (1995) Comparative genomic hybridization in clinical cytogenetics. *Am. J. Hum. Genet.* **57,** 1211–1220.
34. Lomax, B. L., Lestou, V. S., Barrett, I. J., and Kalousek, D. K. (1998) Confined placental mosaicism for chromosome 7 detected by comparative genomic hybridization. *Prenat. Diag.* **18,** 752–754.
35. Isaksen, C. V., Ytterhus, B., and Skarsvag, S. (2000) Detection of trisomy 18 on formalin-fixed and paraffin-embedded material by fluorescence in situ hybridization. *Pediatr. Dev. Pathol.* **3,** 249–255.
36. Bell, K. A., Van Deerlin, P. G., Feinberg, R. F., du Manoir, S., and Haddad, B. R. (2001) Diagnosis of aneuploidy in archival, paraffin-embedded pregnancy-loss tissues by comparative genomic hybridization. *Fertil. Steril.* **75,** 374–379.
37. Henderson, K. G., Shaw, T. E., Barrett, I. J., Telenius, A. H., Wilson, R. D., and Kalousek, D. K. (1996) Distribution of mosaicism in human placentae. *Hum. Genet.* **97,** 650–654.
38. Kalousek, D. K., Langlois, S., Barrett, I., et al. (1993) Uniparental disomy for chromosome 16 in humans. *Am. J. Hum. Genet.* **52,** 8–16.

第四部分　在肿瘤学中的应用



第 22 章 慢性髓细胞性白血病的间期 FISH 研究

Gordon W. Dewald

1. 引言

1.1 本章目标

本章的目的是应用荧光原位杂交来研究慢性髓细胞性白血病（CML）患者的间期核。根据我们的经验，FISH 用来检测 *BCR/ABL* 融合形成的所有形式的费城（Ph）染色体[1,2]。FISH 是常规细胞遗传学研究有价值的辅助手段并且能够应用于同样的标本。因为 FISH 可以用来对增殖的肿瘤细胞中期分裂相和非增殖的间期细胞进行定量研究，这对用外周血或骨髓来评价治疗效果特别有用[2,3]。本章讨论了用 *BCR* 和 *ABL* 探针进行 FISH 相关检测获得经验的途径和确证其有效性的各个方面。并且讨论了在常规临床实践中确保用 *BCR* 和 *ABL* 探针做 FISH 检测质量的方法。

1.2 定义

为了更好地理解本章，读者应该熟悉以下术语：

• 异常值参考范围用 CML 患者预期异常类型细胞所占百分比的范围来表示。

• 非典型类型指在一些带有 t（9；22)(q34；q11.2）的患者细胞中 FISH 产生的不寻常的信号类型。

• FISH 检测的分析敏感度定义为带有预期正常或异常 *BCR/ABL* 融合信号类型的可分析的间期核或中期细胞的百分比。

• 正常切割值是指带有 *BCR/ABL* 融合假阳性信号的可分析细胞的最大百分比。

• 信号类型指示：Ventana 的 *BCR* 探针为红色信号（R），*ABL* 探针为绿色信号（G）；Vysis™ 的 *BCR* 探针为绿色信号（G），而 *ABL* 探针为红色信号（R）。这两种产品的染色质背景颜色都是蓝色的。观察到的 *BCR/ABL* 融合信号（F）为红色和绿色信号接触后产生的大约为黄色的信号。探针的字母用来指示

信号类型。例如，1R1G2F表示一个红色、一个绿色和两个融合信号。

• 典型类型是指带有 t（9；22）（q34；q11.2）的细胞中 FISH 产生的最常见的信号类型。

1.3 建立一个新的 FISH 检测方法

建立一个新的包括染色体特异探针的临床 FISH 检测方法需要对方法和探针进行系统认证、实践来确保熟练，运用于多个病例进行实践以确保实验的一致性和精确判读，以及所有工作的详细文件来满足认证机构的需要[4]。到目前为止，对 CML 的间期 FISH 检测还没有通过美国食品药品管理局的批准。在这种情况下，给任何患者的最终报告应该带有以下字样“这一实验已经很完善并且实验程序由你的实验室名字来决定，这一实验还没有被美国食品药品监督管理局批准”。在本章的注释中简述了一些推荐用来确保 CML 间期 FISH 研究的操作程序。

在临床实践中应用 FISH 检测及其有效性的标准还处于形成阶段。美国医学遗传学学院已经对进行 FISH 检测提出了一些建议[5]。另外，一些特许机构如美国病理学院（College of American Pathologists）[6]和纽约州卫生厅（New York State Department of Health）已经规定了一些质控标准，他们希望这些标准能够在临床检测实验室中应用。虽然探针制造商对他们的产品做了大量检测和质控工作，但重要的是必须认识到实验程序的可信度，结果的分析和判读在于进行这一检测的实验室。

在 CML 的间期 FISH 研究中可以采用几个不同的 FISH 策略和商业化产品。当选择一种 FISH 技术进行临床实践时，考虑这些不同方法的优缺点是非常重要的。虽然在本章中概述了每一种方法，但是只详细描述了 D-FISH，因为它的分析敏感度最高。

1.4 费城染色体

超过 90%的 CML 患者骨髓和血液中会出现带有 t（9；22）（q34；q11.2）的细胞增殖[8]。这一易位可以在 3%的儿童急性淋巴细胞性白血病和 20%的成人急性淋巴细胞性白血病中见到，也可以在 1%的新生的带有不成熟粒细胞的急性髓细胞性白血病患者中见到[9~12]。和 t（9；22）（q34；q11.2）相关的异常 22 号染色体叫做 Ph 染色体[13]。

在我们和他人的实验中，剩余 CML 患者中 5%的患者带有一个 Ph 染色体，这个染色体衍生于 t（9；22）（q34；q11.2）的复杂变异体[14~16]。复杂变异体包括三四个染色体，但是它们都包括位于 9q34 和 22q11.2 的断裂和融合点[15,17]。剩余 5%的 CML 患者的染色体经过常规细胞遗传学分析正常但是经过分子技术

分析异常[18]。这些患者带有一个隐蔽的 Ph 染色体，这一染色体来自于包括染色体 9 和 22 的亚显微结构的插入。所以，所有的 CML 患者带有一个 t（9；22）（q34；q11.2）或一个这种畸变的变异体，“Ph 染色体阴性的 CML”是不存在的[19]。

t(9；22)（q34；q11.2）是位于 9q34 的 Abelson 癌基因（*ABL*）和位于 22q11.2 的断点簇区域（breakpoint cluster region，*BCR*）的断裂，在 Ph 染色体上产生部分 *ABL* 和 *BCR* 基因的 DNA 融合[20]。多数 CML 患者中 t（9；22）（q34；q11.2）包括一个位于主要 *BCR* 基因中 5.8kb 区域内的断裂点[21,22]。在急性淋巴细胞性白血病患者中，大约 50%的患者带有的断裂点位于主要 *BCR* 的 t（9；22）(q34；q11.2)；剩余的患者带有一个位于次要 *BCR* 的断裂点[23]。少数 CML 患者的 Ph 染色体包括一个既不在主要 *BCR* 上也不在次要 *BCR* 上的断裂点[24,25]。不同 CML 患者中 9 号染色体上与 t（9；22）（q34；q11.2）相关的断裂点有所不同，但是通常发生在着丝粒端 200kb 区域内的 ABL 位点内酪氨酸激酶结构域[26]。

1.5 *BCR*/*ABL* 融合和 Ph 染色体

用常规细胞遗传学方法观察到 Ph 染色体是 CML 的证据，但是这不是 *BCR* 和 *ABL* 融合的直接证据。一个异常的 *BCR* 或 *BCR*/*ABL* 融合能够通过Southern 杂交分析、聚合酶链反应（PCR）和 Western 印迹来证明[27~29]。因为这些分子方法用提取的 DNA、mRNA 或蛋白质来操作，所以这些方法不能证明单细胞的 *BCR*/*ABL* 融合。现在用不同颜色的荧光物质标记的 *ABL* 和 *BCR* DNA 探针，通过几种方法检测 *BCR*/*ABL* 融合[1,2,30~32]。这些 FISH 方法可以在单个间期细胞和中期细胞中看见 *BCR*/*ABL* 融合[1,2,33,34]。

1.6 Ph 染色体和 CML 的治疗

现代 CML 的治疗对实验室遗传学工作来说是个新的重要挑战。第一，遗传学检测必须能够分析所有形式的 Ph 染色体以便对 CML 以及 Ph 染色体阳性的急性淋巴细胞性白血病和 Ph 染色体阳性的急性髓细胞性白血病做出精确诊断。第二，遗传学检测必须精确定量治疗前和治疗后异常细胞的数量来帮助内科医生评价他们对疾病治疗的效果。第三，遗传学检测必须能够检测极低水平的异常细胞数量来评价是否治愈或预测早期复发。

到写这篇文章为止，已知唯一能够治愈 CML 的是 HLA 相容的同种异体骨髓移植[35]。不幸的是，许多 CML 患者因为年老或者没有合适的捐献者而不能进行骨髓移植。对于这些患者，治疗选择包括 α 干扰素、羟基脲和白消安。最近的

报道建议说 α 干扰素和其他治疗可以延长慢性阶段并提高生存期[36~40]。令人激动的新治疗方法包括 *BCR/ABL* 酪氨酸激酶抑制因子，如 STI571 对于 CML 患者的治疗显示出很好的效果[41~43]。这些方法当前还处于临床试验阶段并且可以对 CML 患者的治疗产生很大改变。然而，检测和定量 *BCR/ABL* 融合仍然是 CML 治疗的一个重要监测指标。

1.7 用 DNA 探针检测 *BCR* 和 *ABL* 的 FISH 方法

一些研究者建立了他们的“自制”探针来检测 *BCR/ABL* 融合。然而，对于多数实验室来说商业化探针是更好的选择，因为用这些探针可以避免开发和确认“自制”探针所需的严格的质量控制过程。所以，本章将重点讨论 *BCR* 和 *ABL* 的商业化 DNA 探针，因为这些是当前临床实践中广泛应用的产品。

最早的商业化检测 *BCR/ABL* 融合的方法报道于 20 世纪 90 年代早期[1]。从此以后，其他几个检测 *BCR* 和 *ABL* 位点融合的商业化 FISH 方法也相继建立[2,32,44]。结果，现在不同的实验室应用不同的检测方法。因为各种检测方法过程的特点不同，所以应用 FISH 技术可能产生不一致的结果。为了评价不同实验室的 FISH 研究结果，了解所使用的方法并且熟悉它的优点和缺点很重要。

最初用来检测 *BCR/ABL* 融合的商业化 FISH 方法是在 Ph 染色体上产生单一的 *BCR/ABL* 融合信号[1]，这种方法叫做单个融合 FISH 或 S-FISH（图 1 和图 2A）。第二种方法产生两个 *BCR/ABL* 融合信号，一个是在 Ph 染色体上，另一个是在异常的 9 号染色体上[2]，这种方法叫做双融合 FISH 或 D-FISH（图 1 和图 2B）。第三种方法在 Ph 染色体上产生一个 *BCR/ABL* 融合信号在异常 9 号染色体上产生一个额外的信号[45]，这种方法叫做额外信号 FISH 或 ES-FISH（图 1 和图 2C）。

检测 *BCR/ABL* 融合的不同 FISH 方法的正常取舍点之间有显著不同。对 500 个细胞核的分析显示，D-FISH 能够检测到超过 1% 的肿瘤细胞，ES-FISH 能够检测到超过 3% 的肿瘤细胞，S-FISH 能够检测到超过 10% 的肿瘤细胞[46]。目前在临床实践中最广泛应用的方法是 S-FISH 和 D-FISH。和其他检测方法相比较，D-FISH 在检测疾病中敏感度最高，而且评估肿瘤负荷和检测 *BCR*、*ABL* 非典型信号类型最精确，这一信号类型对于预后评估特别重要。

1.7.1 S-FISH

S-FISH 使用的 *ABL* 和 *BCR* 探针衍生于覆盖 Ph 染色体上 *BCR/ABL* 融合位点的 DNA 序列。最初的一个商业化探针混合物利用一个杂交到 9q34 的两个生物素标记的重叠黏粒 *ABL* 探针，这一探针在外显子 Ib 和 II 之间，距离端粒

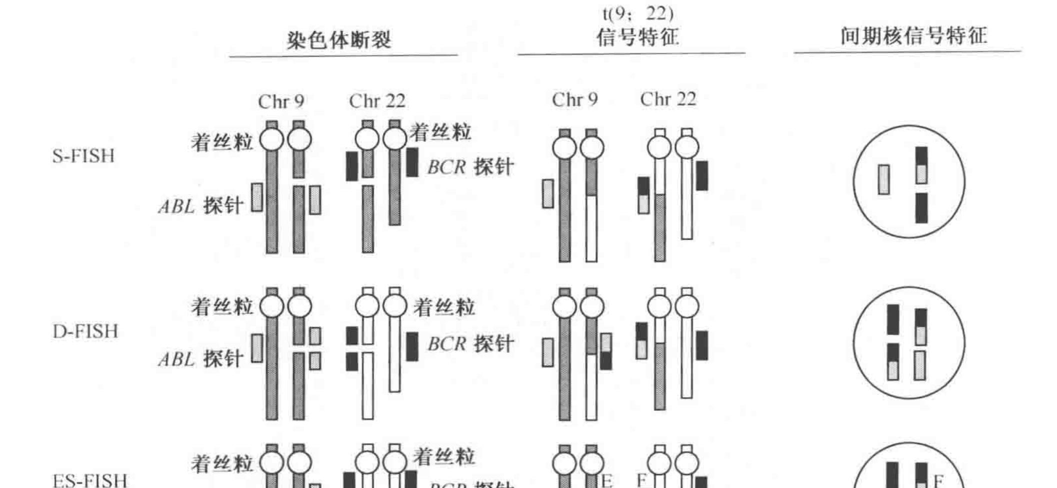


图 1 用 FISH 检测 *BCR/ABL* 融合的三个常用商业化策略的示意图。S-FISH 使用杂交到 9 号染色体端粒侧断裂点的 *ABL* 探针和杂交到 22 号染色体着丝粒端侧断裂点的 *BCR* 探针。一个 9 号和 22 号染色体相互易位，在异常 22 号染色体上产生一个 *BCR/ABL* 融合信号。在间期细胞核中，可以观察到一个红色、一个绿色和一个黄色信号（图 2A）。D-FISH 使用跨越 9 号和 22 号染色体断裂点区域的 *BCR* 和 *ABL* 探针。9 号和 22 号染色体的相互易位在异常的 9 号和 22 号染色体上产生邻接的 *BCR* 和 *ABL* 信号。在间期核中可以看到 1R1G2F 信号（图 2B）。EB-FISH 使用杂交到 9 号染色体上跨越断裂点区域的 *ABL* 探针和杂交到 22 号染色体上 *BCR* 基因着丝粒端的 *BCR* 探针。9 号和 22 号相互易位在异常的 22 号染色体上产生一个 *BCR/ABL* 融合信号和在异常的 9 号染色体上产生一个小 *ABL* 信号。在间期核中可以看到两个红色、一个绿色和一个黄色信号（图 2C）。

端 200kb 的 *ABL* 断裂点区域内[1]。这个混合物也包括三个地高辛标记的重叠黏粒，这些黏粒杂交到位于 22q11.2 的主要 *BCR*。这一探针包括主要 *BCR* 区域 5.8kb 的一部分，而且邻近区域延伸到主要和次要 *BCR* 的着丝粒端。

样品用连接荧光素的抗生物素抗体和连接罗丹明的地高辛抗体处理后，*ABL* 和 *BCR* 信号呈现不同颜色。染色体用 DAPI 复染。这些细胞可以通过带有异硫氰酸荧光素（FITC）和德克萨斯红的双通道滤光片荧光显微镜或带有 DAPI、FITC 和德克萨斯红（Chromotechnology，Battleboro，VT）的三通道滤光片荧光显微镜进行观察。用这种方法，*ABL* 探针有一个绿色信号，主要 *BCR* 探针有一个红色信号，背景染色质是蓝色的。任何包括 *ABL* 和主要 *BCR* 区域融合的易位产生两个靠近的红色和绿色信号或者一个通常显示为黄色的红/绿融合信号（图 2A）。

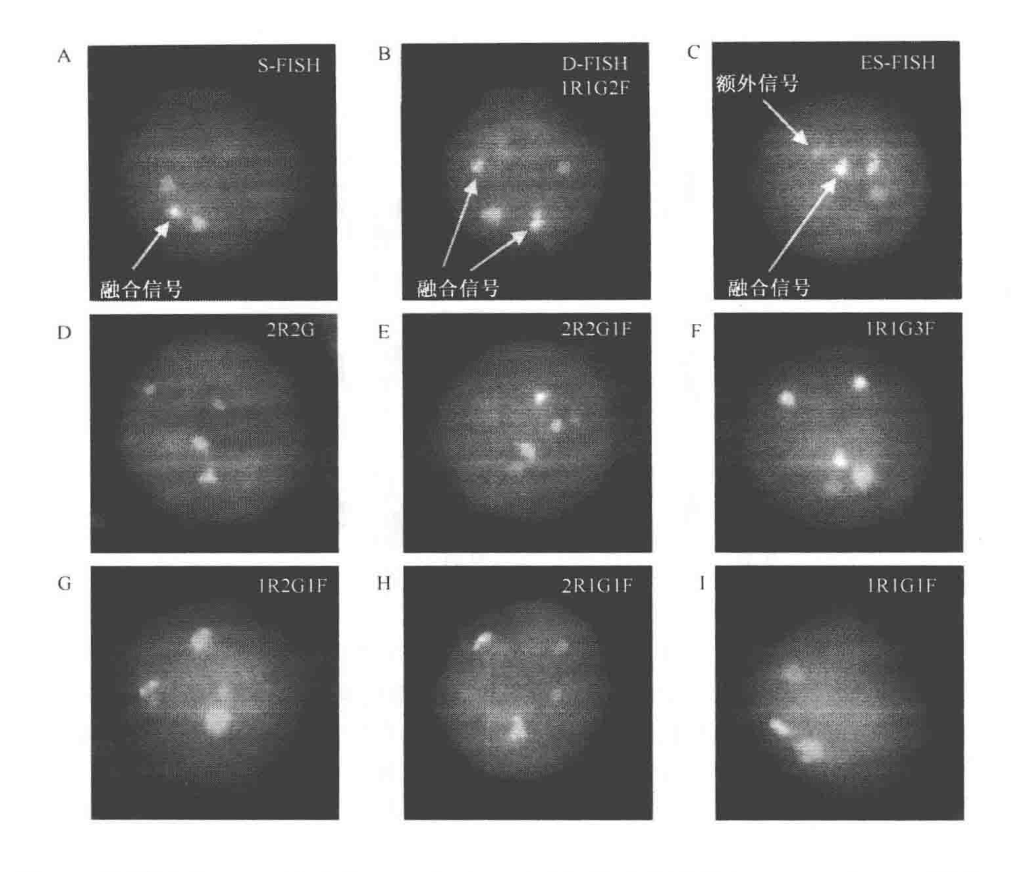


图 2　三个商业化 FISH 策略在 CML 患者的肿瘤细胞中能够检测到 *BCR* 和 *ABL* 融合。（A）在带有 t（9；22）（q34；q11.2）的细胞核中，S-FISH 产生一个红色、一个绿色和一个黄色融合信号。（B）D-FISH 产生 1R1G2F 信号。（C）ES-FISH 产生一个红色、一个绿色、一个小红色和一个黄色融合信号。代表不同 CML 患者间期细胞核的 *BCR* 和 *ABL* 的 Vysis™ D-FISH 类型。（D）正常核有 2R2G 信号。（E）带有复杂 Ph 染色体的细胞核有 2R2G1F 信号。（F）带有 t（9；22)(q34；q11.2）和一个额外 Ph 染色体的细胞核有 1R1G3F 信号。图（G～I）中描述的是通过细胞遗传机制产生的带有不典型 D-FISH 类型的细胞核（见书后彩图）。

这种方法可以检测所有形式的 Ph 染色体，但是经常会产生随机重复信号，用 *BCR*/*ABL* 融合来检测肿瘤细胞核的正常切割值是 10%[1]。许多研究者发现这种方法的 *BCR* 和 *ABL* 荧光信号小而且弱。这些问题主要和使用间接标记技术和小探针有关。这些 *BCR* 和 *ABL* 探针现在不能通过商业途径得到。

随后另一个商业公司生产了一种用一个 S-FISH 方法检测 *BCR*/*ABL* 融合信号的产品，这一信号又大又亮[44]。这些探针现在可以得到并且广泛应用于 CML 患者标本的研究。这一方法采用通过 SpectrumGreen™ 荧光素直接标记的 *BCR*

探针混合物和用 SpectrumOrange™ 荧光素直接标记的 *ABL* 探针。*ABL* 探针的杂交位置覆盖 9 号染色体端粒侧 *ABL* 基因的外显子 4 和外显子 5。*BCR* 探针的杂交位置覆盖了 22 号染色体着丝粒侧 *BCR* 基因（主要是 *BCR* 的外显子 2 和外显子 3）外显子 13 和外显子 14 约 300kb，与次要 *BCR* 区域有很大交叉。

细胞可以通过带有三通道滤光片的荧光显微镜来观察。用这种方法，*ABL* 信号显示橙色，*BCR* 信号显示绿色，背景染色质显示蓝色。任何包括 *ABL* 和 *BCR* 区域的融合显示为橙色和绿色邻近信号或有时显示为黄色的融合信号。

因为这种 *BCR* 和 *ABL* 信号很大，所以这些信号随机重叠的风险很大。结果，这种方法来检测肿瘤细胞 *BCR*/*ABL* 融合的正常切割值为 12.5%[44]。

在 S-FISH 中，用严格的评分标准来研究间期细胞核很重要[1]。当研究者只对 *ABL* 和 *BCR* 都有两个拷贝的间期细胞核评分时，才能得到最一致的结果。这样，多数质量好的间期细胞核或者有两个红色和两个绿色信号（正常核）或者有一个红色、一个绿色和一个融合信号（细胞核有 *BCR*/*ABL* 融合）。当 *BCR* 和 *ABL* 信号重叠或者彼此非常靠近时，它们记作一个融合信号。多数研究者也对有一个红色、一个绿色和两个融合信号的间期细胞核评分，因为这种现象和带有一个额外的 Ph 染色体相一致。

1.7.2 D-FISH

最初的 D-FISH 策略所使用的商业化 *BCR* 和 *ABL* 探针在现在的临床实践中广泛使用[2]。这种方法使用不同的颜色直接标记 *BCR* 和 *ABL* 探针。这套 *ABL* 探针包括几个 DNA 序列，这几个序列杂交到 9q34 并且覆盖了 200kb 的 *ABL* 断裂点区域。这套 *BCR* 探针包括几个 DNA 序列，这几个序列杂交到 22q11.2 并且覆盖了主要和次要 *BCR* 的常见断裂点。

细胞核可以用配备有 FITC 和德克萨斯红的双通道滤光片的荧光显微镜来观察，也可以用配备有 DAPI、FITC 和德克萨斯红的三通道滤光片的荧光显微镜来观察。*BCR* 探针产生一个红色信号，*ABL* 探针产生一个绿色信号，背景染色质为蓝色。根据大量的研究结果，建立了 D-FISH 的评分标准，这一标准限制了细胞的评分过程，这些细胞或者是正常或者是异常的信号类型[2]。正常的细胞核有 2 红 2 绿信号（图 2B）。带有一个 Ph 染色体的异常细胞核或者有 1 红 1 绿 2 融合信号或者有 2 红 2 绿 1 融合信号（图 2D～F）。带有两个拷贝 Ph 染色体的细胞核有 1 红 1 绿 3 融合信号或者 2 红 2 绿 2 融合信号（图 2F）。

一些研究者认为 D-FISH 的评分方法复杂。然而，用这种方法实验的敏感度高、结果一致，能够被多数实验室掌握[47]。D-FISH 方法检测带有 t（9；22）（q34；q11.2）或复杂 t（9；22）的肿瘤细胞核的正常切割值是当检测 500 个细胞核时为 1%，当研究 6000 个细胞核时为 0.079%[2]。

从对 t（9；22）（q34；q11.2）患者的早期研究中观察到一个重要现象，大

约 20%的 t (9; 22) (q34; q11.2) 患者显示出非典型的 D-FISH 信号类型[48]。当用 D-FISH 方法研究这些患者时，用检测肿瘤疾病的不同正常切割值很重要。一些研究者建议非典型 D-FISH 信号类型的患者与典型 D-FISH 信号类型的患者相比较，当用标准 CML 治疗方法治疗时，预后不同[49]。

直到现在，用 *BCR* 和 *ABL* 探针通过 D-FISH 策略检测的商业化试剂仅仅能够从一家公司得到（Ventana Medical Systems, Tucson, AZ）。然而，一种同样的用 *BCR* 和 *ABL* 探针的检测试剂可以从另一家公司得到（Vysis Inc., Downers Grove, IL）。Vysis™公司的 *ABL* 探针覆盖了基因组上大约 650kb 的目的片段，这一片段从精氨酸琥珀酸合成酶（ASS）基因延伸到 *ABL* 基因端粒侧的最后一个外显子。*BCR* 探针的目的片段覆盖了大约 1.5Mb 的基因组距离。*BCR* 探针开始于免疫球蛋白 λ（lambda）轻链位置的可变节段，沿着 22 号染色体通过 *BCR* 基因，在 *BCR* 基因端粒侧约 900kb 的点结束。*BCR* 和 *ABL* 探针分别覆盖它们 t (9; 22) (q34; q11.2) 的断裂点。

我们比较了 Vysis™公司和 Ventana 公司的 D-FISH 探针，发现它们的正常切割值和异常参考范围相同。这些探针在异常细胞核中，产生异常信号的百分比相同，并且在 CML 患者中，产生的信号类型相同。这种比较是基于骨髓和从 10 个正常人及 13 个带有不同形式 Ph 染色体患者的血液样品得出的结论。这些患者包括三个对治疗有反应的患者和 10 个诊断为 CML 的患者。

1.7.3 ES-FISH

在我们的实验中，ES-FISH 的正常切割值是 3%。这种方法能够检测出多数和 *BCR* 及 *ABL* 杂交位置相关的非典型信号类型，但不能检测出全部非典型信号类型[46,48]。ES-FISH 现在还没有在临床实践中广泛应用。

一个"自制"的 ES-FISH 方法使用三种分别用不同颜色标记的 *BCR*、*ABL* 和位于 9 号染色体上 *ABL* 基因着丝粒侧的 *ASS* 基因探针[32]。这种方法使用 SpectrumGreen™标记的探针，这种探针沿着 5′方向从 *BCR* 的外显子 13 和 14 (b2 和 b3) 延伸大约 300kb；使用 SpectrumOrange™标记的探针，这种探针沿着 3′方向从 *ABL* 的外显子 4 和 5 延伸大约 200kb。这些探针用另一个探针如 *ASS* 基因探针来补充，这一探针用除 SpectrumGreen™和 SpectrumOrange™之外的其他颜色的荧光素来标记，如 aqua。ASS 探针杂交到 9q34 *ABL* 断裂点的着丝粒侧，剩余探针杂交到衍生于 t (9; 22) (q34; q11.2) 的异常 9 号染色体上。t (9; 22) (q34; q11.2) 重排了不同探针的杂交位置，所以在中期细胞核中，观察者可以看到在 Ph 染色体上有一个黄色的融合信号，在异常的 9 号染色体上有一个小的浅蓝绿色信号。在间期细胞核中，可以看到一个红色、一个绿色、一个浅蓝绿色和一个黄色信号。

一个商业化的 EB-FISH 方法用两个不同颜色的探针，一个探针跨越了 *ABL*

的断裂点，另一个探针杂交到 *BCR* 基因的着丝粒侧[50]（图 1）。t（9；22）（q34；q11.2）重排了杂交位置，所以观察者看到在 Ph 染色体上有一个黄色融合信号，异常 9 号染色体上有一个小的红色信号。在间期核中，可以看到两个红色、一个绿色和一个黄色杂交信号（图 2C）。

2. 材料

1. 圆形 12mm 的盖玻片（Fisher Scientific. Pittsburgh，PA）。

2. DAPI-I 复染液（Vysis，Inc.，Downers Grove，IL）：储存于－20℃。有效日期见产品标签。

3. DAPI-I 工作液：将一份 DAPI-I 和 9 份 Vectshield 液混合。溶液浓度为 10%。6 个月内用完。

4. 乙醇（70%）：将 300mL 蒸馏水加入到 700mL 无水乙醇中。充分混合储存于室温。一年内用完。

5. 乙醇（85%）：将 150mL 蒸馏水加入到 850mL 无水乙醇中。充分混合储存于室温。一年内用完。

6. 乙醇（100%）：纯谷类酒精（乙醇）。室温下储存 1000mL 液体乙醇，一年内用完。

7. 70%甲酰胺溶液：将 7 份甲酰胺、2 份蒸馏水和 1 份 20×SSC 充分混合。调节 pH 到 6.3。储存于 4℃。3 个月内用完。

8. 甲酰胺（CH_3NO）（US Biochem. Cleveland，OH）：每瓶 500g。储存于 4℃。一年内用完。

9. 固定液（2.5∶1）：25mL 甲醇和 10mL 冰乙酸。每次新配。

10. 冰乙酸：试剂级，满足 ACS 规格。每批 2.5L。一年内用完。

11. LSI® *BCR/ABL* 双色双融合探针（Vysis，Inc.，Downers Grove，IL.）：直接标记探针包括跨越位于 22q11.2 的 *BCR*（绿色）和跨越位于 9q34 的 *ABL*（红色）。储存于－20℃。截止日期见产品标签。

12. LSI® *BCR/ABL* 探针工作液。用以下比例配制探针工作液：8 份 LSI/wcp® 杂交缓冲液，1 份蒸馏水，1 份 LSI *BCR/ABL* 双色双融合探针。储存于－20℃。

13. LSI/wcp® 杂交缓冲液（Vysis，Inc.，Downers Grove，IL.）：每包装 150μL。储存于－20℃。截止日期见产品标签。

14. 甲醇：无水甲醇，不含丙酮。分析试剂。每包装 4L。2 年内用完。

15. Nonidet P40（NP-40）（Vysis，Inc.，Downers Grove，IL.）：每包装 1mL。储存于－20℃。截止日期见产品标签。

16. 0.4× SSC 溶液：把 20mL 20× SSC（pH 6.3）加到 980mL 蒸馏水中并

且充分混合。调节 pH 至 7.0。室温储存。6 个月内用完。

17. 2×SSC 溶液（pH 7.0）：17.53g 氯化钠，8.82g 柠檬酸钠加入到 1L 蒸馏水中或者把 100mL pH 6.3 的 20× SSC 加入到 900mL 蒸馏水中。调节 pH 至 7.0。室温储存。6 个月内用完。

18. 2×SSC/0.1% NP-40：把 100mL pH 5.3 的 20× SSC 加入到 850mL 蒸馏水中。加 1mL NP-40 并且调节 pH 至 7.0。定容至 1L。室温储存。6 个月内用完。

19. 20×SSC 溶液（pH 6.3）：175.3g 氯化钠，88.2g 柠檬酸钠加蒸馏水至 900mL；或者将 132g 的 20×SSC 粉剂（Vysis，Inc.，Downers Grove，IL.）用蒸馏水溶解至终体积为 500mL。用一定浓度的盐酸调节 pH 至 6.3。室温储存。6 个月内用完。

20. 20× SSC 粉剂（Vysis，Inc.，Downers Grove，IL.）：每包装 500g。室温储存。截止日期见产品标签。

21. Vectashield（Vector Laboratories，Inc. Burlingame，CA.）4℃储存。截止日期见产品标签。

3. 方法

目的：这里描述的方法使用的是 Vysis D-FISH *BCR*/*ABL* 探针策略。这些探针跨越了带有 t（9；22)(q34；q11.2）患者的 *BCR* 及 *ABL* 相关的常见断裂点。

3.1 样品

1. 用经过培养的并且按照血液恶性肿瘤标准细胞遗传学程序收获的骨髓和外周血可以得到最好的结果。

2. 对于 FISH 研究来说，用新鲜制备的片子很重要。固定在甲醇和冰乙酸中的细胞储存于－70℃中，直到 FISH 研究需要时才滴片。

3. 外周血和骨髓涂片也可以用这种方法处理。

4. 在对每批患者样品研究中应该包括带有正常和异常细胞的 pH 染色体阳性的对照玻片。

3.2 标本制备

1. 用相差显微镜扫描载玻片，定位一个包括足够数量间期细胞的区域。这些细胞应该形态良好并且重叠细胞应该最少。如果这张载玻片不满意，最好是准

备另一张玻片而不是继续以下操作。

2. 将新制备的载玻片在65℃的烤箱中烤1h或者在90℃的烤箱中烤10min。不要延长高温（60～90℃）烤片的时间。

3. 把这张载玻片放在装有2×SSC溶液的染色缸中，于37℃放置1h。

4. 将载玻片依次放入室温下盛有的70%、85%和100%的乙醇中各1min，将载玻片脱水。气干。

3.3 变性和杂交

或者选择副标题3.3.1中的染色缸法或者选择副标题3.3.2中的HYBrite方法。

3.3.1 染色缸法

1. 对于中期分裂相研究来说，将制备好的载玻片在74℃下70%的甲酰胺中变性1min；对于间期相研究来说，变性时间为2min。

2. 将制备好的载玻片依次放入室温下盛有的70%、85%和100%的乙醇中各1min，将玻片脱水。气干。

3. 取3μL的LSI® *BCR/ABL*探针工作液到0.65mL的小离心管中，离心10s。

4. 将探针混合物漂在74℃的水浴中变性5min。

5. 将离心管从水浴中取出并且马上将探针混合物加到制备好的载玻片上并且把玻片放在45℃的玻片温箱中。

6. 将一张圆形12mm的盖玻片放在杂交区域上。用橡皮泥封住载玻片。将制备好的载玻片放在湿盒中，37℃持续8～20h。

7. 杂交后洗脱步骤见3.2.6。

3.3.2 HYBrite（Vysis，Inc.，Downers Grove，IL.）共变性方法

1. 取3μL LSI® *BCR/ABL*探针工作液直接加到制备好的染色体载玻片上。用圆形12mm的盖玻片盖住杂交区域。用橡皮泥封住盖玻片。

2. 用水填充HYBrite槽。注意不要将槽内的水放得太满，因为这会影响DNA变性过程。

3. 设置HYBrite程序如下：融解温度80℃，融解时间5min，杂交温度37℃，杂交时间20h。

4. 把载玻片放在HYBrite槽中并且让机器执行杂交过程。

5. 把载玻片从HYBrite槽中取出，进行随后3.4的杂交后洗脱步骤。

3.4 杂交后洗脱

1. 去掉橡皮泥。仔细拿掉盖玻片并且丢弃。

2. 把载玻片放在盛有 0.4×SSC 的染色缸中，74℃放置 2min。

3. 拿出载玻片并且把它放在盛有 2×SSC/0.1% NP-40 的染色缸中室温洗涤 1min。

4. 把载玻片从染色缸中，玻片边缘接触纸巾去掉过量的 2×SSC/0.1% NP-40。

5. 把 10μL 的 DAPI-I 工作液加到杂交区域上。

6. 在杂交区域上放一张盖玻片。轻压盖玻片去掉气泡。准备用显微镜分析载玻片。

3.5 显微镜

1. 使用带有 100W 汞灯的高质量的荧光显微镜。

2. 使用 FITC 和德克萨斯红双通道设置来同时观察信号。使用 FITC 或德克萨斯红单通道设置来观察单一荧光。

3. 使用带有适当图像分析系统软件的计算机来捕捉需要记录的细胞图像。

3.6 评分标准

1. Vysis 的 *BCR* 探针产生一个绿色信号（G），*ABL* 探针产生一个红色信号（R），背景染色质为蓝色。观察到的 *BCR*/*ABL* 融合信号为红色和绿色接触的信号或者是一个黄色信号。本章后边的用 F 来指代 *BCR*/*ABL* 融合信号。

2. 正常的间期或中期细胞有 2 红 2 绿信号，没有 F 信号（图 2）。

3. 带有一个 Ph 染色体的异常细胞核或者有 1 红 1 绿 2F 信号，或者有 2 红 2 绿 1F 信号。带有两个 Ph 染色体的细胞核或者有 1 红 1 绿 3F 信号，或者有 2 红 2 绿 2F 信号（见注释 4.1 和图 2）。

4. 带有非典型异常 D-FISH 类型的 Ph 染色体阳性的中期或间期细胞将会有 5 个或者更少的信号，至少一个融合信号。非典型信号类型包括 2 红 1 绿 1F 信号，1 红 2 绿 1F 信号或 1 红 1 绿 1F 信号（见注释 4.4 和图 2）。

5. 如果对于一个细胞是否应该评分或者是否有融合信号有疑问，就不要对这个细胞评分了。

3.7 标本制备的分析

1. 在分析患者样品之前计数 100 个细胞核作为阳性对照来确保这种方法能工作。

2. 如果可能，在治疗前分析 10 个或者更多的 Ph 染色体阳性的中期分裂相来建立 Ph 染色体的信号类型。了解用典型评分标准还是非典型评分标准分析间期细胞核很重要（见注释 4.1 和 4.4）。

3. 至少捕捉两个有代表性的间期相来描述这些研究。

4. 两个观察者应该分别从杂交位置的两三个独立区域中分别计数 250 个邻近的间期细胞核。

5. 如果两个观察者的结果区别大于 5%，第三个观察者应该计数 250 个邻近的细胞，或者应该考虑再杂交一次。

6. 如果两个观察者的结果是可接受的，那么这些结果应该取均数来计算样品中有 *BCR/ABL* 融合信号细胞的百分数。

7. 如果患者有一个典型信号类型的 Ph 染色体并且结果在正常范围内（异常细胞核小于 1%），那么每个观察者应该分析 6000 个细胞核中超过 2750 个细胞核来寻找最小残留病灶（见注释 4.2 和 4.6）。

8. 捕捉载玻片上至少一个区域的图像来描述代表最终结果的几个细胞核。

3.8 结果解释

1. 有经验的观察者应该很少，甚至从来不会在正常样品中观察到假阳性信号类型的细胞核（见注释 4.7～4.15）。对于这些观察者，分析 500 个细胞核的正常切割值是小于 1%，对于 6000 个细胞核，切割值小于 0.079%（见注释 4.1～4.4）。

2. 有经验的观察者在多数未经治疗的 CML 患者中应该检测到多于 90%的异常间期细胞（见注释 4.1）。

3. 带有非典型信号类型的患者假阳性核的频率不同。1 红 2 绿 1F 患者的正常切割值是 1.2%，2 红 1 绿 1F 患者的正常切割值是 1.8%，1 红 1 绿 1F 患者的正常切割值是 23.0%（见注释 4.4）。

3.9 质量控制（见注释 4.16）

1. 任何新试剂在用于临床前应该在对照样品上检测。

2. 对于每一批患者的样品应该带一个 Ph 染色体阳性的对照载玻片。

3. 每一个样品应该由两个记录员独立地分析，他们彼此的结果相差应在5%之内。

4. 每个记录员对照样品的总结结果表格应该保存下来并且常规地对技术问题产生的趋势进行评估。

5. 应该调查所有失败的检测结果并且描述下来以建立问题库。

6. 生成每月的结果报告来评估检测程序。

7. 寻找更多质控的信息（见注释4.7～4.16）。

4. 注释

4.1 Ph染色体的类型不同信号类型也不同

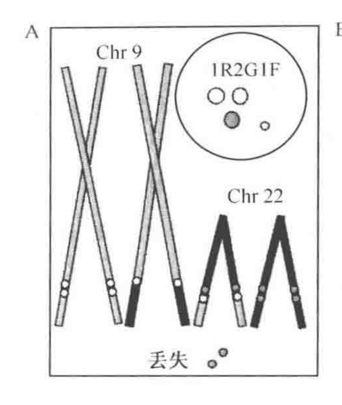
在我们的实验中，所有不同类型Ph染色体最好的检测方法是用D-FISH策略[2]。带有t（9；22）（q34；q11.2）细胞核的典型的D-FISH类型是1红1绿2F（图2B）。这种观察到的结果和两个融合信号相对应，一个在22号染色体上，另一个在9号染色体上，大约80%带有t（9；22）（q34；q11.2）的患者是这种结果。当出现多于一个Ph染色体时，每一个拷贝的Ph染色体，D-FISH将产生一个*BCR/ABL*融合信号。

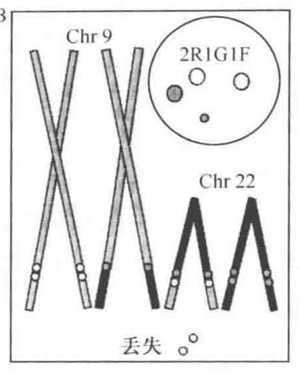
带有复杂Ph染色体的患者通过D-FISH产生不同的信号类型。例如，一个带有t（5；9；22）（q31；q34；q11.2）的患者，在中期分裂相中可以看到Ph染色体上有一个*BCR/ABL*融合信号，在异常的9号染色体上有一个小*ABL*信号，在异常的5号染色体上有一个小*BCR*信号。在间期相中主要的信号类型是2R2G1F（图2E）。通常通过D-FISH可以在异常9号染色体上观察到的*ABL/BCR*融合信号不会在复杂易位中发生。

罕见的*BCR/ABL*信号也可以在带有隐蔽Ph染色体的患者中观察到。FISH研究显示，隐蔽Ph染色体起源于包括*BCR*和*ABL*位点的小的插入。这些插入用传统细胞遗传学方法看不到，但是通过FISH可以检测出来[2]。在我们的实验中，大约50%的带有隐蔽Ph染色体的患者在异常的22号染色体上有一个*BCR/ABL*融合信号。剩余50%的患者在异常9号染色体上有*BCR/ABL*融合信号。在间期核中，隐蔽Ph染色体的主要D-FISH类型是1R2G1F或者2R1G1F。用FISH技术来监测带有隐蔽Ph染色体的患者对治疗的反应很重要，因为传统细胞遗传学方法不能检测这种异常。

三种不典型的D-FISH类型发生在大约20%的带有t（9；22)(q34；q11.2）的患者中[48]。在这些患者中，一部分人丢失*BCR*或者*ABL*，一部分人丢失异常9号染色体上和断裂和融合点相关杂交位点（图2G～I和图3）（见注释4.4）。

实验室工作人员需要知道，这些信号变化类型因为不同的类型需要不同的评





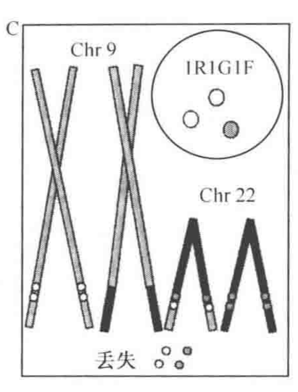


图 3　典型的间期细胞核显示了带有 t（9；22）（q34；q11.2）的细胞的三个非典型 D-FISH 类型的来源。（A）如图 2G，带有一个红色、两个绿色和一个融合信号的细胞核失去了通常易位到异常 9 号染色体的 *BCR* 的杂交位点。（B）如图 2H，带有两个红色、一个绿色和一个黄色融合信号的细胞核失去了通常保留在异常 9 号染色体上的 *ABL* 的杂交位点。（C）如图 2I，带有一个红色、一个绿色和一个融合信号的细胞核失去了通常可以在异常 9 号染色体上观察到的 *ABL* 和 *BCR* 的杂交位点。

分标准，需要利用不同的正常值。对于每个患者来说，在诊断过程中检查几个中期分裂相来建立精确的 *BCR*/*ABL* 信号类型很有用。在治疗后研究中，对于技术人员来说知道每个患者的信号类型很重要，这样可以制定合适的研究方法。

这篇文献是由比较带有变异 Ph 染色体的 CML 患者和带有典型 Ph 染色体的患者的临床意义混合而成。正在进行几个临床试验来检测 CML 治疗的新方法。这对于带有变异易位的患者建立这种临床意义将是一个重要机会，并且能够决定新的治疗方案是否对所有带有不同变异 Ph 染色体的患者同样有效。

4.2　FISH 监测 CML 的治疗

对骨髓的传统细胞遗传学研究广泛应用于临床实践中来监测对于 CML 患者各种治疗形式的效果，特别是对于干扰素和 STI571 的治疗效果[36,39,52～54]。相当多的证据显示干扰素治疗后 Ph 染色体阳性中期分裂相百分数的变化和预后之间有很强的相关性。所有中期分裂相中 Ph 染色体阳性中期分裂相的百分数减少到小于 33%的患者，存活率和慢性时相延长最佳[36～38,40,55]。

在临床实践中，内科医生通常收集干扰素治疗后 3～6 个月之间的 CML 患者骨髓吸取物来得到细胞遗传数据。因为技术原因，如压紧（packed）骨髓或者再生不良，不可能总是获得合适的骨髓样品来进行染色体研究。虽然收集患者的外周血很容易，但是处理后血中有丝分裂细胞的数目通常不足以通过传统细胞遗

传学研究来精确定量肿瘤细胞的比例。

用 FISH 方法分析血液和骨髓中的间期细胞核对于研究 CML 患者治疗前和治疗后疗效的评估也是很有用的[2,3,50,56,57]。诊断 CML 患者肿瘤细胞的百分数通常很高，当有效治疗之后，肿瘤细胞的百分数进行性下降（图 4）。评估治疗反应最好的 FISH 检测是那些高敏感度的方法，如 D-FISH 和 ES-FISH[3,50]。用这些检测方法，治疗前骨髓中 Ph 染色体阳性细胞核的百分数通常是 85%～99%。治疗成功后，肿瘤细胞的百分数通过 D-FISH 检测可以下降到 1%，通过 ES-FISH 检测可以下降到 3%。

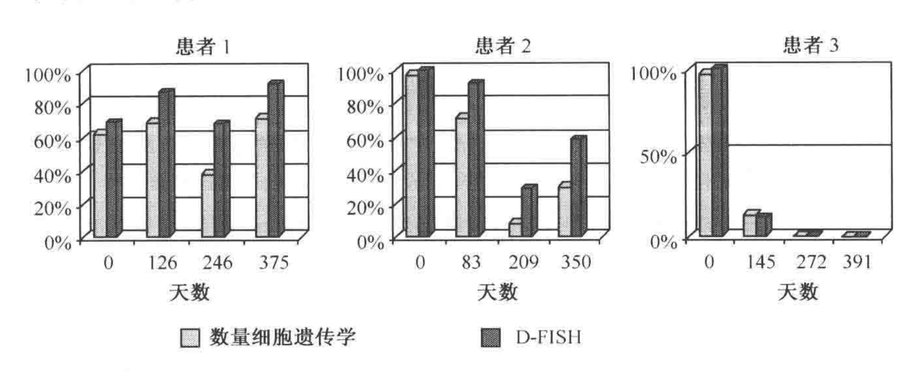


图 4　D-FISH 和传统细胞遗传学研究对于监测接受干扰素治疗的 CML 患者是有用的。这两种方法的结果在评估 Ph 染色体阳性细胞的百分数上不同，但是对治疗反应的改变和时间密切相关。对于治疗无反应者，患者 1 的 D-FISH 和细胞遗传的结果一致；患者 2 起初对治疗有反应但是然后复发；患者 3 对治疗完全有反应并且达到细胞遗传学的缓解，没有 Ph 染色体阳性的中期分裂相，D-FISH 结果正常。

一些项目研究了利用 FISH 检查血液从而监测 CML 患者对治疗的反应[3,50,58]。一个这样的研究项目包括 37 对彼此在 24～96h 之内收集的骨髓和血液标本，这些标本取自 10 个干扰素治疗前和治疗中的 CML 患者[3]。研究人员了解到用 D-FISH 分析 500 个骨髓和外周血的细胞核能够检测到小于 1%的肿瘤细胞，并且产生的结果比定量细胞遗传更敏感。这样，用 FISH 方法从骨髓或血液中计数 500 个间期相能够取代定量细胞遗传来监测 CML 患者对治疗的反应。

通过 D-FISH 方法检测治疗前血液和骨髓中肿瘤细胞核的百分数发现大约 70%的患者不同[3]（图 5）。虽然用从外周血的 D-FISH 研究中收集来的数据通过简单的线性回归模式可能会预测骨髓中 Ph 染色体阳性细胞核百分数的变化，但是这种预测并不精确。然而，血液和骨髓中的肿瘤细胞的百分数在治疗过程中发生同样的变化，并且和骨髓细胞的定量细胞遗传学研究结果密切相关。这表示可以用 D-FISH 检测 CML 患者的血液来监测治疗。

在用 D-FISH 分析细胞遗传学研究完全缓解患者的 6000 个骨髓和外周血细

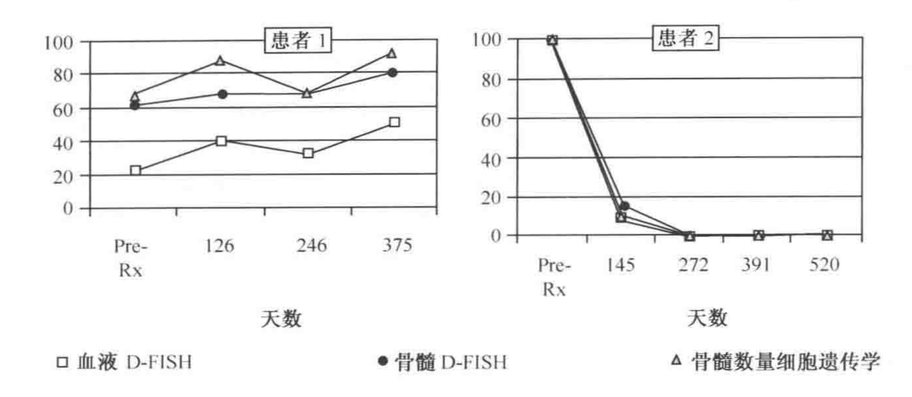


图 5　D-FISH 能够用于研究外周血来监测 CML 患者对干扰素的治疗反应。在一些患者中，如患者 1，骨髓中肿瘤细胞的百分数比血液中的高。随着时间的变化，骨髓和血液中肿瘤细胞的百分数以同样的方式改变。

胞中，几乎找不到异常的细胞[3]。所以，用 D-FISH 方法分析血液中间期细胞核能够取代骨髓的定量细胞遗传学研究，甚至当患者细胞遗传学完全缓解时也适用。这样，就不需要经常收集 CML 患者的骨髓样品来监测治疗。

因为很多 CML 患者用 STI571 治疗，所以对于遗传学检测一个新的重要挑战变得明显。一些这样的患者由于 *BCR/ABL* 融合基因的扩增而出现药物抵抗。这种现象可以通过 FISH 方法检测单个肿瘤细胞观察 *BCR/ABL* 信号簇或多个融合信号。需要对一系列有 *BCR/ABL* 融合信号的 STI571 药物抵抗的患者进行有组织的研究来理解如何精确地计数 *BCR/ABL* 融合的扩增信号和了解 *BCR/ABL* 融合信号扩增的临床相关性。

4.3　中期分裂相和间期核 FISH 研究的比较

多数研究 CML 患者的医生通过比较治疗前和治疗后 Ph 染色体阳性中期分裂相的百分数来评估治疗效果。根据 Ph 染色体阳性中期分裂相百分数的不同，提出对治疗反应不同的分类方案[36,39,40,52,53]。最常用的分类方案是由 M. D. Anderson 癌症研究中心的研究人员使用的，根据治疗反应的不同分为完全、部分、较少和无[40]。这些分类是根据观察到的 Ph 染色体在中期分裂相中分别占 0、1%～34%、35%～95%和大于 95%来划分的。

第一个常见的错误概念是未经治疗的 CML 患者通常治疗前 Ph 染色体阳性的中期分裂相的百分数为 100%，将观察到的治疗后中期分裂相的百分数直接翻译成治疗后 Ph 染色体阳性中期分裂相百分数的变化。然而，只有 90%的 CML 患者治疗前通过传统细胞遗传学研究在每一个中期分裂相中确实有一个 Ph 染色

体[14]。剩余 10%的 CML 患者有隐蔽 Ph 染色体或者为正常和 Ph 染色体阳性中期分裂相混合的嵌合体。当用数量细胞遗传学和 D-FISH 技术研究时，为了校准嵌合体，标准化治疗前和治疗后肿瘤细胞的百分数是有用的。一个途径是将治疗前肿瘤细胞的百分数划分成治疗后肿瘤细胞的百分数然后乘以 100。

第二个错误概念是 FISH 确定的 *BCR/ABL* 融合的间期核的百分数能够像传统细胞遗传学研究结果一样，用做评价治疗后反应的方案。和传统细胞遗传学研究不一样，D-FISH 的研究结果显示所有 CML 的患者甚至在治疗前在他们的骨髓中既有正常细胞又有肿瘤细胞。这种观察结果归于 FISH 方法对于检测 CML 患者治疗前少量正常细胞百分数的高度敏感性。

此外，间期核 FISH 研究也可以用来评估非增殖细胞。与之相比，标准细胞遗传学检测评估增殖细胞。细胞遗传学研究通常包括超过 25 个中期分裂相，所以，结果将因样品的错误而受到显著影响。例如，如果检查了 25 个中期分裂相，仅有一个 Ph 染色体阳性中期分裂相的样品错误结果导致评估肿瘤负荷的错误为 4%。相反，FISH 研究通常分析 500 个间期细胞核。这样，一个带有 *BCR/ABL* 融合信号间期核的样品错误在评估肿瘤负荷中，错误仅仅为 0.20%。

因为中期分裂相和间期核分析之间这些以及其他的不同，所以毫不奇怪带有 Ph 染色体中期分裂相的百分数和带有 *BCR/ABL* 融合信号的间期核的百分数结果不一致。然而，几个研究人员表示，治疗后 Ph 染色体阳性中期分裂相百分数减少的患者，也会发生 *BCR/ABL* 融合信号间期核百分数的减少[3,50]。这样，FISH 结果能够用来评估治疗后反应，但是 Ph 染色体阳性中期分裂相的百分数和带有 *BCR/ABL* 融合信号的非增殖细胞的百分数不一致。

CML 国际研究组织最近比较了一系列 CML 患者带有 Ph 染色体中期分裂相百分数和带有 *BCR/ABL* 融合信号间期核的百分数[59]。这项工作包括 65 个患者用干扰素 α 和干扰素 α 与阿糖胞苷联用的随机、双盲的临床试验。通过传统细胞遗传学研究来计算 Ph 染色体中期分裂相百分数的变化和通过 D-FISH 计算 *BCR/ABL* 融合信号的细胞核的百分数的变化来评估患者的进展。患者的“最佳反应”定义为任何患者每一系列的样品治疗后肿瘤细胞的百分数相对于基线研究最低。这些研究人员也根据 Ph 染色体中期分裂相下降的百分数或者用 M. D. Anderson 对治疗后反应的细胞遗传分类方案来划分每个患者在任何给定时间的最好反应。

在对骨髓或外周血的染色体研究和 D-FISH 研究之间，肿瘤细胞最佳百分数变化的 Spearman 相关性呈中等强度。最佳百分数变化指每个 CML 患者在他们起始治疗后超过 12 个月后，Ph 染色体阳性细胞的百分数最低。当最佳百分数变化被分成 M. D. Anderson 反应分类时，在骨髓染色体研究和骨髓或者血液的 D-FISH研究之间有不一致的趋势。这种骨髓染色体研究的结果趋向于“下降”最佳反应分类。这是标准细胞遗传学证实的分化肿瘤细胞的百分数和 D-FISH 证

实的非增殖肿瘤细胞间期核百分数所给出的预期的结果。

因为 CML 患者肿瘤细胞比正常细胞分化更频繁，所以 Ph 染色体阳性中期分裂相的百分数通常比带有 *BCR/ABL* 融合信号的间期核的百分数高。这样，当应用不同的方法时，应该谨慎地解释数据。还没有人根据间期 FISH 研究的结果产生 CML 的治疗后反应方案。多数达到细胞遗传学水平完全缓解的患者当用 D-FISH 研究时异常细胞核小于 1%[1]。

虽然 FISH 研究能够检测很低水平的异常细胞核，但是这些方法在评估超过 1%的肿瘤细胞的治疗后反应时效果最好。这些作者不知道 FISH 研究和分子遗传学研究，如 RT-PCR 在评估 CML 方面的任何直接比较。所以，比较这些方法在预测只有低水平异常细胞核时，如骨髓移植后复发方面的效果，还不知道哪种方法更好。

4.4 CML 的异常 D-FISH 类型

D-FISH 方法在带有 t（9；22）（q34；q11.2）的 CML 患者中可以检测到两个 *BCR/ABL* 融合信号。最近一项包括 147 个 CML 患者的 D-FISH 研究表明，*BCR* 和 *ABL* 的杂交位点有非常大的遗传学变化（图 2G～I 和图 3）[48]。在这些患者中，81%的患者可以观察到典型的 D-FISH 类型，但是剩余 19%的患者是三种不同非典型类型中的任何一种。每种非典型类型和以下某种情况一致：*BCR* 基因 3′端丢失的部分通常易位到 9 号染色体上，*ABL* 基因 5′端丢失的区段通常保留在易位的 9 号染色体上，或者 *BCR* 基因 3′端易位丢失的部分和 *ABL* 基因 5′端丢失的区段通常都保留在易位的 9 号染色体上。

这些非典型类型和所有形式的包括 t（9；22）（q34；q11.2）的 Ph 染色体、复杂易位、隐蔽易位相关。对于有典型类型的患者，500 个间期细胞核的正常切割值为小于 1%。相反，对于 FISH 类型为 1R2G1F 和 2R1G1F 的患者，正常切割值为小于 1.8%，对于 FISH 类型为 1R1G1F 的患者，正常切割值为小于 23%。这样，当用 D-FISH 或者 ES-FISH 方法来检测和定量带有非典型类型的细胞核时，需要特殊的评分标准[48]。36 个带有典型 D-FISH 类型的患者对干扰素 α-2b 和阿糖胞苷治疗有反应的百分数和 7 个带有非典型类型的患者相同[48]。

Sinclair 等[49]最近研究了 11 个 CML 患者的存活率，这些带有 t（9；22）（q34；q11.2）或者不同类型易位的患者在异常的 9 号染色体上断裂点和融合点临近的 DNA 有大的缺失。他们发现缺失区域跨越几个 Mb，并且有不同的分子断裂点。他们报告了这些缺失可以作为诊断方法来检测，并且在所有 Ph 染色体阳性的中期分裂相中出现。提示了这些缺失更像是起源于疾病早期，甚至可能在 Ph 染色体形成的同一个时期。Kaplan-Meier 的分析显示了带有缺失的患者生存中位数为 36 个月。相反，没有检测到缺失的患者显示生存中位数为大于 90 个

月。生存率的不同有显著的统计学意义，并且多变量分析显示了分子缺失独立于年龄、性别、外周血胚细胞的百分数和血小板计数，在估计预后方面很重要。这些研究人员提示 t（9；22）（q34；q11.2）不仅可以通过融合产生一个显性的临时癌基因，而且可以导致影响疾病进展的一个或多个基因的丢失。如果在分析了大量 CML 患者之后，这一观察到的结果仍为真实情况，那么因为 D-FISH 可以检测到非典型的信号类型，将在临床实践中特别有用[48,50]。

4.5 细胞遗传和 FISH 方法对于 CML 患者加速相和胚细胞危象的研究

用不同的 FISH 技术来研究 CML 患者加速相和胚细胞危象出现相关的染色体演变是可能的。然而，假定新的 CML 治疗手段成功，几乎不用花费任何努力就可以发展和检测如 FISH 之类的技术，因为这些技术在临床实践中几乎没有实际利用价值。然而，在 CML 患者中除了 Ph 染色体确实发生，知道其他染色体异常也很重要。一些这样的异常，如额外的 Ph 染色体，可以影响检测 *BCR/ABL* 融合信号的结果。其他染色体异常用 FISH 检测 *BCR/ABL* 融合将检测不出来，但是需要本章范围之外的其他 FISH 策略。然而，内科医生能够对一个又一个患者做这些检测来最大限度地在某些特殊临床情况中利用这些方法。

大约 71%的胚细胞危象的 CML 患者至少有下面异常染色体之一：+8，i（17q），+19 或者有一个额外的 Ph 染色体[60]。大约 15%的胚细胞危象的 CML 患者有−7，−17，+17，+21，−Y 或者 t（3；21）（q26；q22）。染色体演变的研究有助于预测即将发生的胚细胞危象的类型[61,62]。例如，del（7）（q22）和−7 通常是和淋巴胚细胞危象相关的染色体异常；i（17q）和+8 通常提示髓细胞样的胚细胞异常。

染色体演变的研究可以解释为什么治疗后反应和中位生存时间与非整倍体的程度呈反比。然而，染色体演变可能是一种细胞遗传机制，干扰用特殊遗传治疗如 STI571 治疗疾病的尝试。毫不意外，这些产生简单 *BCR/ABL* 融合的染色体异常将对 *BCR/ABL* 融合的酪氨酸激酶抑制因子有反应。

一些染色体异常甚至在 Ph 染色体出现时证明了一个可变的遗传表达[63]。例如，观察到的带有 inv（3）（q21q26）的 Ph 染色体通常和 CML 患者的成巨核细胞性转化相关；带有 inv（16）（p13q22）的 Ph 染色体通常和 CML 患者异常嗜酸粒细胞的胚细胞危象相关；带有 del（13）（q12q14）的 Ph 染色体和 CML 患者的骨髓纤维化的胚细胞危象相关；带有 t（15；17）（q22；q12）的 Ph 染色体和 CML 患者急性前髓细胞白血病同样表型的胚细胞危象相关。这样，对 CML 患者染色体演化的研究能够有助于解释某些患者不寻常的细胞形态。

4.6 CML 的遗传检测策略

细胞遗传学、分子遗传学和 FISH 都是研究 CML 患者样品的有用的技术手段。这几种方法各有优点和不足[64]。然而，没有一种单一的方法能够满足治疗 CML 患者的临床医师的所有需要。对于任何给定的临床情况，综合考虑检测策略的精确性和成本效益很重要。而且，随着新的临床挑战的产生，检测策略作为方法学随着时间的推移不断改进。不断发展更好的遗传检测方法的过程应该是一个不断前进的过程。

对于 CML，建议几个可供选择的遗传检测策略，但是最好的方法组合根据当地技术条件的不同在不同情况下选择不同的方法。然而，下面的 CML 检测策略将在很多情况下都适用。对于诊断来说，可以做数量细胞遗传学分析，分析骨髓中 25 个或者更多的中期分裂相。这一检测有助于识别 Ph 染色体的种类并且对不仅有 CML 一种疾病的患者还可以揭示染色体的异常，这将有助于做出正确诊断。在染色体分析显示为正常染色体但是细胞形态和 CML 相一致的样品中，FISH 研究可以检测到一个隐蔽的 Ph 染色体。

对于 CML 患者，进行 FISH 研究来建立治疗前带有 *BCR/ABL* 融合信号的间期细胞核的百分数基线很重要。对于进行骨髓和血液 FISH 研究来对治疗后的样品进行适当地比较很有用。治疗前的样品可以提供检测出少量 Ph 染色体阳性中期分裂相的机会来建立信号类型的种类，这样确保对随后的样品选择合适的评分标准。对于治疗中的患者，在治疗周期间隔，可以对外周血进行 D-FISH 研究来评估疗效。结果，在治疗中就可以不像现在经常性地收集患者的骨髓来监测治疗。如果分析 500 个细胞核，结果低于 1%，那么就需要研究 6000 个细胞核来增加检测的敏感性。

直接比较 FISH 和 RT-PCR 技术检测同一样品的低水平残留病灶、检测结果与生存率及估计预后的相关性研究还没有进行。一些文献提出 RT-PCR 在检测仅有低水平肿瘤细胞患者的残留病灶中更敏感[65~67]。也许回答绝对治愈的问题最好的手段是分子遗传学程序，但是结果是否如此还不知道。

4.7 FISH 检测 *BCR/ABL* 融合的多机构的经验

最近，美国 28 个实验室合作来研究 D-FISH 检测骨髓细胞中 *BCR/ABL* 融合[47]。虽然这些实验室用 D-FISH 方法检测，但是他们的许多经验也可以运用于 S-FISH 和 ES-FISH。

在一个分三部分的研究中，D-FISH 探针用于研究骨髓中间期细胞核的 *BCR/ABL* 融合[47]。最初，每个实验室各自用 D-FISH 程序来识别正常和异常

样品。然后，这些实验室以盲法共同研究 20 个正常和 20 个异常的样品并且计算做这些研究花费的时间。最后，每一个实验室和两个从一个参与机构来的专家研究 6 个 0～98%系列稀释的异常细胞核。

用已经报道的通过 D-FISH 方法分析 500 个细胞核，异常细胞核的正常切割值是 1%的计分标准，参与者报告没有假阴性病例，但有 15 个假阳性病例[3]。每一个假阳性病例包括低水平的异常细胞核，范围是从 1.0%～6.6%。这些错误归因于应用计分标准不一致，并且缺乏评分低水平异常细胞核样品的经验。参与者提供的系列稀释的结果近似于异常细胞核的预期百分数，但是专家的结果显示更精确。

多机构的研究显示需要进行队列研究，并且用盲法来仔细设计临床评估方法，建立正常值和异常值的参考范围。这一研究也揭示了在进行临床实践检测之前获得 FISH 经验的重要性。从这些结果中可以清楚地看到对样品的精确定量评估比定性评估需要更多的技术和客观评分细胞核的经验。

这个多机构研究结果显示 D-FISH 对于检测低水平 *BCR/ABL* 融合细胞核是一个有力的新方法。对于那些不是用 D-FISH 方法得到的结果，在这种方法应用于临床实践之前，有必要将这种方法用于大量未知编号样品的实践。而且，单独观察间期核很难确定 FISH 方法的杂交位点。例如，简单、复杂和隐蔽的 Ph 染色体都能够产生和经典 Ph 染色体相关的一些相同的信号类型。为了精确解释观察到的间期核中的信号类型，有必要检查每个病例的一些中期分裂相。对于每个患者应该进行治疗前的研究来建立 D-FISH 信号类型。然而，在用 FISH 方法研究 CML 的过程之前，应该用这种制造商提供的评分标准来分析至少 500 个细胞核。

对于任何有非典型信号类型的骨髓和血液样品，不能用标准的评分标准来分析。当超过 20%的细胞核显示为一个可识别的非典型信号类型时，那么就要怀疑这一样品为非典型类型。非典型类型必须通过分析几个 Ph 染色体阳性的中期分裂相来证实，确定染色体基础的信号类型。

多机构的研究结果显示 FISH 的正常切割值必须分别在每个实验室建立而不是采用通用值，因为评分荧光信号不像数染色体那样简单。因此，每个实验室必须在发临床报告结果前，建立自己每一项 FISH 检测的正常和异常的参考范围。当建好这样的参考值范围之后，每一个临床样品就能区分为正常或者异常。

4.8 CML 的 FISH 研究的投入评估

28 个实验室一起工作并且测量 D-FISH 相关的工作时间，这些工作包括混合 4 种液体、在准备好的玻片上杂交细胞核并且评分 500 个细胞核[47]。虽然各个实验室之间所用时间显著不同，但是对于所有的参与者 D-FISH 的平均时间消耗是每个样品 128min。依据我们的经验，这一结果显然比标准细胞遗传学研究

25个骨髓中期分裂相的平均时间236min更有利。这样，D-FISH显著地减少了监测CML患者治疗的时间投入。

在不同实验室间工作时间的差异可能归于在测定工作时间和计量一些需要时间短的操作上缺乏经验。但是更可能的解释是时间的变化大多因工作效率的不同。进行工作负荷研究有助于建立和FISH相关的劳动力成本研究，并且能够评估进行这些研究的人员需要。

4.9 用FISH方法验证*BCR*和*ABL*探针

用FISH方法分析中期分裂相比分析间期核更精确，因为单个染色体的形态更有助于估计*BCR*和*ABL*的杂交位置[1,2]。而且，中期分裂相呈平面分布，单个染色体分散良好，所以减少了很多间期核相关的问题，如信号重叠等评分问题[68]。然而，评分间期核比评分中期分裂相更优越。例如，间期核的数目远远大于中期分裂相的数目而且不需要细胞培养。尽管如此，对于任何用*BCR*和*ABL*探针进行FISH研究的实验室而言，选择不但能够熟练评分中期分裂相而且能够熟练评分间期核的实验人员很重要。

如果以一致的方式收集数据并且以无偏倚的模式连续评分细胞，那么FISH结果将是客观的并且能够进行统计学评估的。在临床实践中用*BCR*和*ABL*探针进行FISH研究之前，熟练掌握这些技术并且制定收集到数据的可信度很重要[4]。最后，每个实验室必须验证FISH程序并且获得检验已知样品和未知样品的经验。仅仅读CML研究相关的FISH文献，买商业化的*BCR*和*ABL*探针，然后不经过在当地验证这一程序就在临床实践中应用这种检测方法，这不是好的实验室实践。

实验室能够以不同的方式验证*BCR*和*ABL*探针在FISH检测中的应用。本章将介绍一个验证和获得FISH经验的途径，这一途径使用*BCR*和*ABL*的DNA探针。经过一些修改，这一途径也可以用于验证许多其他的以FISH为基础的检测。这一提出的方法包括以下几步：熟悉FISH，学会评分细胞的一致性，确定对中期分裂相和间期核的分析敏感性，进行队列研究然后做临床评估。

4.10 熟悉FISH

实验室工作人员应该读CML的FISH研究文献来理解这一技术的应用。应该选择一个商业化的检测系统来最好的满足实验室的临床需要。当前使用D-FISH策略的检测系统更好，并且至少可以从两家公司得到这样的产品。实验室工作人员应该用一个或两个已知正常和异常的样品来获得应用这一检测系统最初的经验。在这一熟悉过程中，实验室工作人员应该建立在细胞周期不同阶段的

细胞中信号的大小、亮度和完整性的印象。实验室工作人员应该评估用于这一检测系统的设备，并且对于观察到的结果寻找可能的干扰因素。

4.11 学会信号评分的一致

可以进行两个实验来获得间期核中不同信号类型的经验。建议两个或者更多的独立评分者进行同一个实验，因为对他们结果的比较将使技术员间在观察信号颜色、解释信号完整性（如分裂信号和融合信号）和其他无法预期的检测结果间潜在的差异最小。

在最初的实验中，每个技术员应该从一个正常个体和一个已知 CML 患者中连续观察 100 个间期核，记录所有的信号类型。这些结果对于理解检测中可能遇到的不同 FISH 信号类型很重要。

在第二步实验中，实验室工作人员开始学习如何应用一致的评分标准并且收集数据来检验这一技能。评分中最常见的三个问题是由于重叠信号、信号分离和偶尔探针未杂交导致的。实验室工作人员应该仔细复习供应商建议的评分标准。然后，他们应该用建议的评分标准从正常人和已知的 CML 患者中连续分析 100 个间期核。最后计算满足评分标准的间期核的百分数和其他信号类型细胞核的百分数。

4.12 中期分裂相细胞的分析敏感性

一旦实验室工作人员熟悉了用 FISH 检测 *BCR*/*ABL* 融合，通过用 *BCR* 和 *ABL* 探针分析间期细胞能够确定实验程序的特点。间期核的分析敏感性是 *BCR* 和 *ABL* 杂交到正确位置上的百分数。这一实验可以通过评分 100 个植物凝集素刺激的外周血培养物中增殖细胞的中期分裂相来完成。每一个技术员应该记录每一个中期分裂相中观察到的信号数并且通过标准细胞遗传学方法来识别可能的位置范围。这可以通过细胞形态学分析来完成，通过一些图像系统或者一系列的显带技术可以产生反向 DAPI 带型类型。

4.13 间期核的分析敏感性

应该分别进行实验来确定间期核 FISH 检测的实验程序特点。对于 CML，应该分别进行血液和骨髓的研究，因为这些是临床实践中要检查的组织。至于间期核的分析敏感性，定义为评分带有预期信号类型细胞核的百分数。例如，如果从一个正常个体中分析 100 个间期核，每个细胞核正如预期那样有两个 *BCR* 信号和两个 *ABL* 信号，那么分析敏感性为 100%。另一方面，如果 100 个细胞核

中 75 个细胞核有除了两个 *BCR* 和两个 *ABL* 信号以外的任何数目的信号，那么分析敏感性将是 75%。非常高比例的细胞核满足这一评分标准很重要。例如，间期核的分析敏感性大约为 90%最好。

间期核的分析敏感性应该从 5 个不同的已知正常和异常个体中取相同数量的间期细胞核来计算。为了评估不同实验间的差异，应该由两个或者更多的技术员在不同时间分别对每个样品进行准备、处理和评分。通常共分析 500 个细胞核就足够了。例如，从 5 个带有已知 FISH 信号类型的个体中各取 100 个细胞核来分析。间期核比中期细胞的分析敏感性低是因为间期核更小，并且比分散的中期分裂相有更大的三维厚度。这就导致间期核中重叠信号、探针对基因组 DNA 杂交的干扰比对中期分裂相的更大[68]。

4.14 队列研究

一旦完成这些最初的实验，实验室工作人员应该进行一个队列研究来获得更多的用 *BCR* 和 *ABL* 探针做 FISH 检测的经验，获得他们能够正确进行这些检测的自信。这可以由两个或者更多的独立进行盲法队列研究的评分员来完成，这一研究包括 5 个正常的样品和 5 个异常的样品。在评分过程中，每个技术员应该记录 100 个连续间期核中的信号类型，这些间期核满足这一评分标准。在临床实践中，分析的细胞核数量根据对检测预期的敏感度的需要而不同。在我们的实验中，FISH 方法的敏感度如 D-FISH 可以通过成本效益模式分析 500 个满足评分标准的细胞核来达到最佳敏感度。

队列研究完成之后，计算每个患者满足评分标准间期核的百分数很有用。计算不满足评分标准的细胞百分数也很有用。从主观上评估是否任何患者的结果表现出与预期的分析敏感度以及其他先前的实验结果不同。

评估在最初和将来确认实验中的观察者间的差异也很有用。这可以通过对每一个样品减去任何两个观察者之间每一个信号类型细胞的百分数来客观地完成。这个数字有时叫做观察者间的 Δ 值[47]。如果对于任何样品，Δ 值大于 5%，那么可以有理由怀疑评分者应用不同的评分标准。确定两个评分者之间差异的来源很重要。这可以由评分者一起分析一系列的细胞核并且对逐个细胞核讨论评分偏差的来源来完成。

4.15 临床评估研究

在将 *BCR*/*ABL* 探针的 FISH 检测用于临床实践之前进行临床评估研究是很有用的。这一临床评估研究应该检测新方法在临床实践中可能出现的所有参数。应该建立正常值和异常值的参考范围。因为这些数据在不同实验室中根据经验和

熟练程度的不同而发生变化。这些数据很重要，应该由每一个实验室独立确定。

开始临床评估研究之前，研究人员应该完成包括收集、运输和制备样品的分析前、分析中和分析后的各种因素的标准化。另外，应该建立评分标准、分析敏感度、临床检测敏感度所需的细胞数和结果的解释。而且，应该识别和说明所有安全的组织。

临床评估研究可以由不同的方式来完成并且可以包括任何数量的样品，但是从统计学观点来看，样品越多越好。一个合理的研究应该基于 20 个或者更多的正常样品和超过 20 个已知为 CML 患者的样品。编码样品很重要，以便可以进行盲法研究。两个技术员应该独立地评分每一个样品，确定记录所评分细胞的信号类型和不满足这一评分标准的细胞数量。

当临床评估完成以后，用正常样品的数据来计算正常切割值。正常值可以用几种不同的方法来计算。虽然均数加上或者减去两个或者三个标准差的方法在文献中很常见，但是这种方法很难被广泛接受。这一统计方法很难被接受的原因是因为它所估计的这些数据符合钟形曲线。对于 *BCR/ABL* 融合研究来说，有100%正常细胞的患者和未经治疗的有超过 90%的肿瘤细胞的患者并不适用于这种分析方法。虽然一些统计方法能够计算正常切割值[1,69]，但是下面的方法相对更简单并且能够满足用 FISH 的 CML 研究。

要达到预期检测敏感度所需分析的细胞数依据所需的可信度而不同，并且根据排除嵌合体水平和探针的分析敏感度而不同[70]。任何探针的分析敏感度越接近 100%，观察到的任何数目的异常信号越能表明第二个细胞系的出现。评分过程仅仅代表进行 FISH 研究全部投入的 52%[47]。在我们和他人的实验中，计分500 个细胞核并不困难，记录这一数据并且在 20min 内捕捉二三个有代表性的图像。这样，评分少量细胞什么都得不到。而且，当检查 500 个或者更多的细胞核时，这个新的 FISH 检测的高度敏感性变得特别有效。在一项研究中发现，分析500 个间期细胞核和用传统细胞遗传学研究 25 个中期分裂相来检测正常和异常细胞显示有相似的敏感性[3]。

对于用 *BCR/ABL* 融合的 FISH 方法来检测间期细胞核，一个分析敏感度接近 100%的好方法是仅评分那些满足正常或者肿瘤信号类型评分标准的细胞。这一方法成功的关键是定义严格的评分标准然后始终如一地执行。S-FISH 和D-FISH的严格的评分标准已经出版[1,2]。

建立正常切割值和异常参考范围的一种方法是以随机和盲法研究一系列正常和异常的样品为基础的。这一系列应该包括 20 个或者更多的样品，这些样品被预先指定用来计算正常切割值。对于每一个预先指定为正常的样品，应该确定假阳性细胞核的数量。这一分析预测了在任何患者中出现异常细胞核的最大数量。用这些数字来计算 95%一侧可信区间分析的上限，这些数字符合二项式分布。表 1 显示了一系列用二项式公式计算 200 个或者 500 个细胞核的样品，假阳性信

号类型细胞核为 0～15。异常参考范围（带有异常信号类型细胞的百分数）能够用从未经治疗的 CML 患者的样品中得到的数据来计算。

表 1　根据二项式分布，评分 200 个或者 500 个细胞，观察假阳性细胞的数目，用一侧为 95％的可信区间计算的正常切割值

评分细胞数/个	假阳性细胞	假阳性细胞的百分数/%	正常切割值/%
200	0	0.0	1.5
200	1	0.5	2.5
200	2	1.0	3.0
200	3	1.5	4.0
200	4	2.0	4.5
200	5	2.5	5.0
200	6	3.0	6.0
200	7	3.5	6.5
200	8	4.0	7.0
200	9	4.5	7.5
200	10	5.0	8.5
200	11	5.5	9.5
200	12	6.0	10.0
200	13	6.5	10.5
200	14	7.0	11.5
200	15	7.5	12.0
500	0	0.0	0.6
500	1	0.2	1.0
500	2	0.4	1.2
500	3	0.6	1.6
500	4	0.8	1.8
500	5	1.0	2.0
500	6	1.2	2.4
500	7	1.4	2.6
500	8	1.6	2.8
500	9	1.8	3.2
500	10	2.0	3.4
500	11	2.2	3.6
500	12	2.4	3.8

续表

评分细胞数/个	假阳性细胞	假阳性细胞的百分数/%	正常切割值/%
500	13	2.6	4.2
500	14	2.8	4.4
500	15	3.0	4.6

作为临床评估的一部分，在一系列样品中确定不满足评分标准的细胞的比例很有用。这一数字能够用和计算正常值一样的统计学方法计算出来，并且作为一个质量控制参数在将来的研究中应用。当不能评分细胞的比例超过预期的范围时，这一检测可能遇到预料之外的技术问题。

临床敏感性和特异性也能够从临床评估研究的结果中计算出来。临床敏感性指正确识别的真阳性样品的百分数。临床特异性指正确识别的真阴性样品的百分数。如果样品数足够大，那么计算检测的预期值就很有用。预期值是通过检测正确识别的真阳性和真阴性样品的百分数计算出来的。

当出现大的实验程序的改变，如改变探针或者探针浓度时，进行等效的检测来重新确定检测程序很重要。应该进行研究以确定这些改变使程序与旧程序相当或更优。根据程序改变的性质，可能有必要对程序进行重新确定。对于不显著的变化，如同一探针批次的改变，对标准对照样品进行一系列的分析和评估就足够了。

4.16 FISH 研究的质量控制

FISH 研究中使用质控的目的是确保实验步骤工作正常、验证应用评分标准的一致性、监测技术人员的能力、帮助解释实验中的数值。用 *BCR* 和 *ABL* 的 FISH 研究使用不同颜色的探针。评分标准仅仅需要分析哪些带有预期信号类型的细胞。在这种情况下，评分标准就应该可以马上检测出系统或者技术的错误。例如，没有观察到 *BCR* 和 *ABL* 信号表示实验步骤不能正常进行。

在实验过程中，做阳性对照很有用。阳性对照包括已知百分数的正常细胞核和 Ph 染色体阳性的细胞核。对于定量的 FISH 研究，阳性和阴性对照的细胞混合物很重要，因为它代表了临床检测的需要，如定量正常细胞和异常细胞。每一个或者每一批样品的试验中都应该包括对照样品。对照样品可以从用于临床实践研究的 CML 患者的剩余细胞中获得。进行白细胞传递（leukophoresis）患者也是 CML 对照细胞的好的来源。

检测步骤、试剂和技术人员能够通过标准对照样品的数据图表来监测。这种方法也可以用来监测新批次试剂的性能并且能确定探针的性能。而且，标准对照

的数据图表也可以用来评估方法学变化的等效性，如间接标记探针到直接标记探针的转换。这一图表应该包括根据队列研究和临床评估研究得到的均数和标准差。当实验过程中有显著变化，如出现新的技术员时，更新这些统计数字很重要。

标准对照的以下任何一种结果都能够显示检测问题：①这一结果的偏差超过均数的三个标准差；②两个连续的数值超过均数的两个标准差；③4 个连续的数值超过均数的一个标准差；④10 个连续的数值落在均数的一侧[71]。任何一种情况都能显示在实验过程中出现了技术上或人员问题，需要进行研究来识别变异的来源并且采取恰当的纠正措施。小的纠正措施包括重新检测样品或者再增加一个评分者；大的纠正措施可能需要改变实验步骤、使用新的试剂或者新的对照、对对照结果的基本统计数据重新评估、补救性地培训实验人员或者甚至完全重新验证检测。

（袁海昕 译，曾　瑄 校）

参考文献

1. Dewald, G. W., Schad, C. R., Christensen, E. R., et al. (1993) The application of fluorescent *in situ* hybridization to detect Mbcr/abl fusion in variant Ph chromosomes in CML and ALL. *Cancer Genet. Cytogenet.* **71,** 7–14.
2. Dewald, G. W., Wyatt, W. A., Juneau, A. L., et al. (1998) Highly sensitive fluorescence *in situ* hybridization method to detect double BCR/ABL fusion and monitor response to therapy in chronic myeloid leukemia. *Blood* **91,** 3357–3365.
3. Buño, I., Wyatt, W. A., Zinsmeister, A. R., Dietz-Band, J., Silver, R. T., and Dewald, G. W. (1998) A special fluorescent *in situ* hybridization technique to study peripheral blood and assess the effectiveness of interferon therapy in chronic myeloid leukemia. *Blood* **92,** 2315–2321.
4. Schad, C. and Dewald, G. (1995) Building a new clinical test for fluorescence *in situ* hybridization. *App. Cytogenet.* **21,** 1–4.
5. ACMG (ed.) (1999) *American College of Medical Genetics Laboratory Practice Committee Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories.* American College of Medical Genetics, Bethesda, MD.
6. CAP (ed.) (2000) *College of American Pathologists Cytogenetics Inspection Checklists.* College of American Pathologists, Northfield, IL.
7. NYDH(ed.) (2000) *New York Dept. of Health, Wadsworth Center for Laboratories and Research Genetics Laboratory Checklists.* New York State Department of Health, New York.
8. First International Workshop on Chromosomes in Leukaemia. (1978) Chromosomes in Ph1-positive chronic granulocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* **39,** 305–309.
9. Demetrick, D. J., Dewald, G. W., Lanman, J., and Bahou, W. F. (1996) The thrombin receptor gene is centromeric to the common proximal breakpoint in patients with the 5q-syndrome: identification of a previously unrecognized chromosome 5 inversion. *Br. J. Haematol.* **92,** 339–343.

10. Matsue, K., Miyamoto, T., Ito, M., and Tsukuda, K. (1995) Late appearance of the Philadelphia chromosome with monosomy 7 in a patient with de novo AML with trilineage myelodysplasia. *Am. J. Hematol.* **49,** 341–346.
11. Bloomfield, C. D., Goldman, A. I., Alimena, G., et al. (1986) Chromosomal abnormalities identify high-risk and low-risk patients with acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **67,** 415–420.
12. Ribeiro, R., Abromowitch, M., Raimondi, S., Murphy, S., Behm, F., and Williams, D. (1987) Clinical and biologic hallmarks of the Philadelphia chromosome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **70,** 948–953.
13. Mitelman, F. (ed.) (1995) *An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.* S. Karger, Basel.
14. Hicks, G. and Dewald, G. (1985) Incidence and types of variant Ph chromosomes in 378 patients with a Ph chromosome. *Karyogram.* **11,** 105.
15. Fitzgerald, P. and Morris, C. (1991) Complex chromosomal translocations in the Philadelphia chromosome leukemias: serial translocations or a concerted genomic rearrangement? *Cancer Genet. Cytogenet.* **57,** 143–151.
16. Koduru, P., Goh, J., Allen, S., et al. (1991) Different patterns of chromosome and molecular breakage in classic Ph chronic myelogenous leukemia (CML) and variant Ph1 CML. *Hematol. Pathol.* **5,** 57–66.
17. Hagemeijer, A., Bartram, C., Smit, E., van Agthoven, A., and Bootsma, D. (1984) Is chromosomal region 9q34 always involved in variants of the Ph translocation? *Cancer Genet. Cytogenet.* **13,** 1–16.
18. van der Plas, D., Grosveld, G., and Hagemeijer, A. (1991) Review of clinical, cytogenetic and molecular aspects of Ph-negative CML. *Cancer Genet. Cytogenet.* **52,** 143–156.
19. Travis, L. B., Pierre, R. V., and DeWald, G. W. (1986) Ph1-negative chronic granulocytic leukemia: a nonentity. *Am. J. Clin. Pathol.* **85,** 186–193.
20. Westbrook, C., Rubin, C., Carrino, J., Le Beau, M., Bernards, A., and Rowley, J. (1988) Long-range mapping of the Philadelphia chromosome by pulsed-field gel electrophoresis. *Blood* **71,** 697–702.
21. Heisterkamp, N., Stephenson, J., Groffen, J., Hansen, P., de Klein, A., Bartram, C. and Grosveld, G. (1983) Localization of the c-abl oncogene adjacent to a translocation breakpoint in chronic myelocytic leukemia. *Nature* **306,** 239–242.
22. Groffen, J., Stephenson, J., Heisterkamp, N., de Klein, A., Bartram, C., and Grosveld, G. (1984) Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, Bcr, on chromosome 22. *Cell* **36,** 93–99.
23. Rodenhuis, S., Smets, L., Slater, R., Behrendt, H., and Veerman, A. (1985) Distinguishing the Philadelphia chromosome of acute lymphoblastic leukemia from its counterpart in chronic myelogenous leukemia (letter). *N. Engl. J. Med.* **313,** 51–52.
24. Selleri, L., Narni, F., Emilia, G., Colo, A., Zucchini, P., and Venturelli, D. (1987) Philadelphia-positive chronic myeloid leukemia with a chromosome 22 breakpoint outside the breakpoint cluster region. *Blood* **70,** 1659–1664.
25. Hochhaus, A., Reiter, A., Skladny, H., Melo, J., Sick, C., and Berger, U. (1996) A novel BCR-ABL fusion gene (e6a2) in a patient with Philadelphia chromosome-negative chronic myelogenous leukemia. *Blood* **88,** 2236–2240.
26. Bernards, A., Rubin, C., Westbrook, C., Paskind, M., and Baltimore, D. (1987) The first intron in the human *c-abl* gene is at least 200 kilobases long and is a target for translocations in chronic myelogenous leukemia. *Mol. Cell. Biol.* **7,** 3231–3236.

27. Stock, W., Westbrook, C., Peterson, B., et al. (1997) Value of molecular monitoring during the treatment of chronic myeloid leukemia: A Cancer and Leukemia Group B study. *J. Clin. Oncol.* **15,** 26.
28. Shtivelman, B., Lifshitz, R., Gale, R., and Canaani, E. (1983) Fused transcript of abl and bcr genes in chronic myelogenous leukaemia. *Nature* **315,** 550.
29. Konopka, J., Watanabe, S., Singer, J., Collins, S., and Witte, O. (1985) Cell lines and clinical isolates derived from Ph-positive chronic myelogenous leukemia patients express C-abl proteins with a common structural alteration. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82,** 1810.
30. Arnoldus, E., Wiegant, J., Noordermeer, I., et al. (1990) Detection of the Philadelphia chromosome in interphase nuclei. *Cytogenet. Cell. Genet.* **54,** 108–111.
31. Tkachuk, D., Westbrook, C., Andreeff, M., et al. (1990) Detection of bcr-abl fusion in chronic myelogeneous leukemia by *in situ* hybridization. *Science* **250,** 559–562.
32. Sinclair, P., Green, A., Grace, C., and Nacheva, E. (1997) Improved sensitivity of BCR-ABL detection: A triple-probe three-color fluorescence *in situ* hybridization system. *Blood* **90,** 1395–1402.
33. Seong, D., Kantarjian, H., Ro, J., et al. (1995) Hypermetaphase fluorescence in situ hybridization for quantitative monitoring of Philadelphia chromosome-positive cells in patients with chronic myelogenous leukemia during treatment. *Blood* **86,** 2343–2349.
34. Seong, C.-M., Giralt, S., Kantarjian, H., et al. (2000) Early detection of relapse by hypermetaphase fluorescence in situ hybridization after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* **18,** 1831–1836.
35. Appelbaum, F., Clift, R., Radich, J., Anasetti, C., and Buckner, C. (1995) Bone marrow transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Semin. Oncol.* **22,** 405–411.
36. ICSG. (1994) Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia. Interferon alfa-2a as compared with conventional chemotherapy for the treatment of chronic myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med.* **330,** 820–825.
37. Talpaz, M., Kantarjian, H., Kurzrock, R., Trujillo, J., and Gutterman, J. (1991) Interferon-alpha produces sustained cytogenetic responses in chronic myelogenous leukemia. Philadelphia chromosome-positive patients. *Ann. Int. Med.* **114,** 532–538.
38. Kloke, O., Niederle, N., Qiu, J., et al. (1993) Impact of interferon alpha-induced cytogenetic improvement on survival in chronic myelogenous leukaemia. *Br. J. Haematol.* **83,** 399–403.
39. Allan, N., Richards, S., and Shepherd, P. (1995) UK Medical Research Council randomised, multicentre trial of interferon-alpha n1 for chronic myeloid leukaemia: improved survival irrespective of cytogenetic response. *Lancet* **345,** 1392–1397.
40. Silver, R. T., Woolf, S. H., Hehlmann, R., et al. (1999) An evidence-based analysis of the effect of busulfan, hydroxyurea, interferon, and allogeneic bone marrow transplantation in treating the chronic phase of chronic myeloid leukemia: developed for the American Society of Hematology. *Blood* **94,** 1517–1536.
41. Thiesing, J., Ohno-Jones, S., Kolibaba, K., and Druker, B. (2000) Efficacy of STI571, an Abl tyrosine kinase inhibitor, in conjunction with other antileukemic agents against Bcr-Abl-positive cells. *Blood* **96,** 3195–3199.
42. Druker, B. (1999) Status of BCR-ABL Tyrosine Kinase Inhibitors in CML, in *Hematology* (Schechter, G., ed.), American Society of Hematology, Washington D. C., pp. 160–171.
43. Laurent, E., Talpaz, M., Kantarjian, H., and Kurzrock, R. (2001) The BCR gene and Philadelphia chromosome-positibe leukemogenesis. *Cancer Res.* **61,** 2343–2355.
44. Kobzev, Y., Domracheva, E., Zakharova, A., Khoroshko, N., Turkina, A., and Dewald, G. (1998) Fluorescence *in situ* hybridization studies of interphase nuclei for assessing

response to therapy in patients with chronic myeloid leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* **106,** 128–134.

45. Nacheva, E., Holloway, T., Brown, K., Bloxham, D., and Green, A. (1993) Philadelphia-negative chronic myeloid leukaemia: detection by FISH of BCR-ABL fusion gene localized either to chromosome 9 or chromosome 22. *Br. J. Haematol.* **87,** 409–412.
46. Dewald, G., Ketterling, R., Wyatt, W., and Stupca, P. (2002) Cytogenetic studies in neoplastic hematologic disorders, in *Clinical Laboratory Medicine* (McClatchey, K., ed.), Williams and Wilkens, Baltimore, pp. 658–685.
47. Dewald, G., Stallard, R., Alsaadi, A., et al. (2000) A multi-center investigation with D-FISH BCR/ABL1 probes. *Cancer Genet. Cytogenet.* **116,** 97–104.
48. Dewald, G., Wyatt, W., and Silver, R. (1999) Atypical BCR and ABL D-FISH patterns in chronic myeloid leukemia and their possible role in therapy. *Leuk Lymphoma* **34,** 481–491.
49. Sinclair, P. B., Nacheva, E. P., Leversha, M., et al. (2000) Large deletions at the t(9;22) breakpoint are common and may identify a poor-prognosis subgroup of patients with chronic myeloid leukemia. *Blood* **95,** 738–743.
50. Le Gouill, S., Talmant, P., Milpied, N., et al. (2000) Fluorescence in situ hybridization on peripheral-blood specimens is a reliable method to evaluate cytogenetic response in chronic myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* **18,** 1533–1538.
51. Sandberg, A. (1990) Chronic myelocytic leukemia, in *The Chromosomes in Human Cancer and Leukemia* (Sandberg, A. ed.), Elsevier, New York, pp. 458–520.
52. Thaler, J., Gastl, G., Fluckinger, T., et al. (1996) Interferon alpha-2c therapy of patients with chronic myelogenous leukemia: long-term results of a multicenter phase-II study. Austrian Biological Response Modifier (BRM) Study Group. *Ann. Hematol.* **72,** 349–355.
53. Kantarjian, H., Smith, T., O'Brien, S., Beran, M., Pierce, S., and Talpaz, M. (1995) Prolonged survival in chronic myelogenous leukemia after cytogenetic response to interferon-alpha therapy. *Ann. Intern. Med.* **122,** 254.
54. Hehlmann, R., Heimpel, H., Hasford, J., et al. (1994) Randomized comparison of interferon-alpha with busulfan and hydroxyurea in chronic myelogenous leukemia. *Blood* **84,** 4064–4077.
55. ICSG. (1995) Italian Cooperative Study Group on Chronic Myeloid Leukemia. Chronic myeloid leukemia, BCR/ABL transcript, response to alpha-interferon and survival. *Leukemia* **9,** 1648–1652.
56. Cuneo, A., Bigoni, R., Emmanuel, B., et al. (1998) Fluorescence in situ hybridization for the detection and monitoring of the Ph-positive clone in chronic myelogenous leukemia: comparison with metaphase banding analysis. *Leukemia* **12,** 1718–1723.
57. Nolte, M., Werner, M., Ewig, M., et al. (1996) Fluorescence in situ hybridization (FISH) is a reliable diagnostic tool for detection of the 9;22 translocation. *Leuk. Lymphoma.* **22,** 287–294.
58. Muhlmann, J., Thaler, J., Hilbe, W., et al. (1998) Fluorescence in situ hybridization (FISH) on peripheral blood smears for monitoring Philadelphia chromosome-positive chronic myeloid leukemia (CML) during interferon treatment: a new strategy for remission assessment. *Genes Chromosomes Cancer* **21,** 90–100.
59. Lesser, M. L., Dewald, G. W., Sison, C. P., and Silver, R. T. (2000) Correlation of three methods of measuring cytogenetic response in chronic myeloid leukemia (CML). *Canc. Genet. Cytogenet.* In press.
60. Mitelman, F. (1993) The cytogenetic scenario of chronic myeloid leukemia. *Leuk. Lymphoma* **11 Suppl,** 11–15.
61. Diez-Martin, J. L., Dewald, G. W. and Pierre, R. V. (1988) Possible cytogenetic distinction between lymphoid and myeloid blast crisis in chronic granulocytic leukemia. *Am. J. Hematol.* **27,** 194–203.

62. Sadamori, N., Gomez, G., and Sandberg, A. (1983) Therapeutic and prognostic value of initial chromosomal findings at the blastic phase of Ph1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood* **61,** 935–939.
63. Dewald, G. and Wright, P. (1995) Chromosome abnormalities in the myeloproliferative disorders. *Semin. Oncol.* **22,** 341–354.
64. Dewald, G. W., Juneau, A. L., Schad, C. R., and Tefferi, A. (1997) Cytogenetic and molecular genetic methods for diagnosis and treatment response in chronic granulocytic leukemia. *Cancer Genet. Cytogenet.* **94,** 59–66.
65. Liu Yin, J. and Tobal, K. (1999) Detection of minimal residual disease in acute myeloid leukaemia: Methodologies, clinical and biological significance. *Brit. J. Haematol.* **106,** 578–590.
66. Hochhaus, A., Lin, F., Reiter, A., et al. (1996) Quantification of residual disease in chronic myelogenous leukemia patients on interferon-alpha therapy by competitive polymerase chain reaction. *Blood* **87,** 1549–1555.
67. Hochhaus, A., Lin, F., Reiter, A., et al. (1996) Quantitative molecular methods to monitor the response of CML patients to interferon-α. *Bone Marrow Transplant.* **17,** S41.
68. Chase, A., Grand, F., Zhang, J. G., Blackett, N., Goldman, J., and Gordon, M. (1997) Factors influencing the false positive and negative rates of BCR-ABL fluorescence in situ hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* **18,** 246–253.
69. Thall, P., Jacoby, D., and Zimmerman, S. (1996) Estimating genomic category probabilities from fluorescent in situ hybridization counts with misclassification. *Appl. Statist.* **45,** 431–446.
70. Dewald, G., Stallard, R., Al Saadi, A., et al. (1998) A multicenter investigation with interphase fluorescence in situ hybridization using X- and Y-chromosome probes. *Am. J. Med. Genet.* **76,** 318–326.
71. Westgard, J., Quam, E., and Barry, P. (eds.) (1998) *How do you plot and interpret results on a Levey-Jennings chart?* Westgard Quality Corp., Madison, WI.

第23章　病理学中的显色原位杂交和FISH

Bae-Li Hsi，Sheng Xiao，Jonathan A. Fletcher

1. 引言

荧光原位杂交（FISH）技术能够快速检测各种组织，包括新鲜和存档标本中的染色体异常。这些技术已经为临床细胞遗传学和研究机构所广泛接受。然而，这些方法却并非常用于非细胞遗传学诊断的病理学服务，部分是因为FISH图像设备不能普遍地为负责组织学诊断的诊断医生（外科病理学家）所用。因此，各种原位杂交探针和检测方法的改进令人满意，尤其是过去的5年，已经可以通过光学显微镜，以酶学原位杂交来进行常规分析。

实际上，所有人类恶性肿瘤都含有克隆的染色体异常，它们部分与从非瘤祖先细胞到癌症的肿瘤发生的进展有关。这些异常经常影响涉及细胞增殖、凋亡和浸润的基因，借此可以解释可作为癌症诊断标志的很多临床病理学特征。尽管常规组织学检查是外科病理学的主要依据，但越来越多的情形是细胞遗传学标记提供了关键的诊断和预后信息。在许多情况下，细胞遗传学异常是对组织病理学前后关系的最好解释。一个众所周知的例子就是乳腺癌中的*ERBB2*（*HER2*/*NEU*）基因扩增，其中评价肿瘤浸润癌部分的扩增尤为重要[1]。因此，需要检测策略，使之能够判读组织学标本的分子细胞遗传学分析。理想的是，这些分析可以在普通光学显微镜下判读，而不需要荧光系统[2~4]。那样的话，分子细胞遗传学分析能够更广泛地为外科病理学团体所采纳，与免疫组织化学非常相似，并且能够具有与对已知病例所进行的常规组织学评价相关的“特殊染色”效用。

结合标准的组织学评价来判读基于DNA检测的概念并不是新的。然而，几乎没有多少进行显色原位杂交（CISH）用于亮视野检测的病理学/组织学实验室，甚至有很少用这个方法进行双色染色体易位、扩增或缺失检测的实验室。此处描述的方法可用于广泛的病理学标本的FISH或CISH分析，以评价各种染色体异常。这些病理标本包括石蜡切片、冰冻材料和细胞病理学标本。重要的是，这些方法提供了一种机制，借此，分子细胞遗传学评价能够常规整合于标准的组织病理学或细胞病理学检查中。

大多数组织病理学分析是在间期细胞中进行，而不是在细胞遗传学的中期

分裂相中进行。因此，单一序列和其他位点特异性探针，如α卫星探针，更适于组织病理学或细胞病理学辅助分析，而非基于中期分裂相的分子细胞遗传学方法，如比较基因组杂交和染色体涂染。值得注意的是，位点特异性 ISH 同样可用于细胞遗传学或存档的标本。几乎任何来源的完整细胞核都可用于分析，这包括：①组织切片；②印片；③细胞学制备；④骨髓涂片；⑤从厚的石蜡切片中（如 25～50μm）进行核分解；⑥从冰冻标本中进行核分解；⑦细胞遗传学标本。如上所述，采用组织学切片最关键的优点是肿瘤细胞在其天然结构中为人们所研究。

1.1 FISH 与 CISH 的优缺点

与 CISH 相比，FISH 更为广泛地用于分子细胞遗传学分析，特别是细胞遗传学实验室。然而这两个方法各自有自己的优缺点。FISH 方法在其本质上的优点是探针检测可以通过直接检测的方法进行。相反，显色检测方法是间接确定的，除了探针杂交外，在细胞核复染前，CISH 一般还需要至少两个附加的步骤。例如，探针可以用 FITC 或罗丹明标记，从而用 FISH 方法直接检测。同样的探针也可以用生物素标记，然后通过依次用链霉亲和素-HRP 及 DAB 孵育，以 CISH 方法进行检测。与 CISH 检测通常所用的大分子质量检测蛋白（如碱性磷酸酶）相比，FISH 的另一个优点是探针和检测试剂穿透到靶染色体区域则更容易完成。另一方面，CISH 有几个特别与石蜡切片应用相关的优点。例如，一般来说石蜡切片组织学细节比较适宜亮视野复染和观察而非荧光。这部分是因为细胞和细胞外蛋白可导致 FISH 信号在石蜡切片上暗淡、弥散并出现自发荧光（见注释 1）。另一个因素是，在 CISH 常规复染（如苏木素）后，大范围的组织切片很容易整体扫描。用低倍物镜（10×或 20×）很容易观察到形态学细节，而 CISH 探针信号本身甚至在这种较低的放大倍数下也容易看见。另一方面，荧光探针信号和复染一般从本质上来说仅适宜在较高放大倍数下观察。CISH 的另一个优点是探针信号不会很快淬灭，因此载玻片可以存档。

1.2 组织学石蜡切片的 FISH /CISH

事实上对于所有病理学标本来说，在石蜡切片上进行 FISH 或 CISH 的一个优点是石蜡包埋的组织容易获得。另外，固定和包埋的方法可以标准化，为随后的 FISH 或 CISH 检测提供了一个非常稳定的平台。其独特的优点是当细胞位于其天然原始结构时观察其细胞形态学上微细的差别上是最佳的。一旦单个细胞核从石蜡组织切片中分离出来后，再辨认其不同的细胞类型则更困难。组织学石蜡

切片（一般为 4～6μm）的缺点是切片厚度实际上小于所有哺乳动物细胞核的直径。因此，细胞核总是不完整的，染色体缺失的评价可能面临着挑战。另一方面，基因扩增或相互易位的评价相对容易（图 1）。为了较好地代表完好的核，可以用较厚的切片。然而，核重叠又是一个问题。

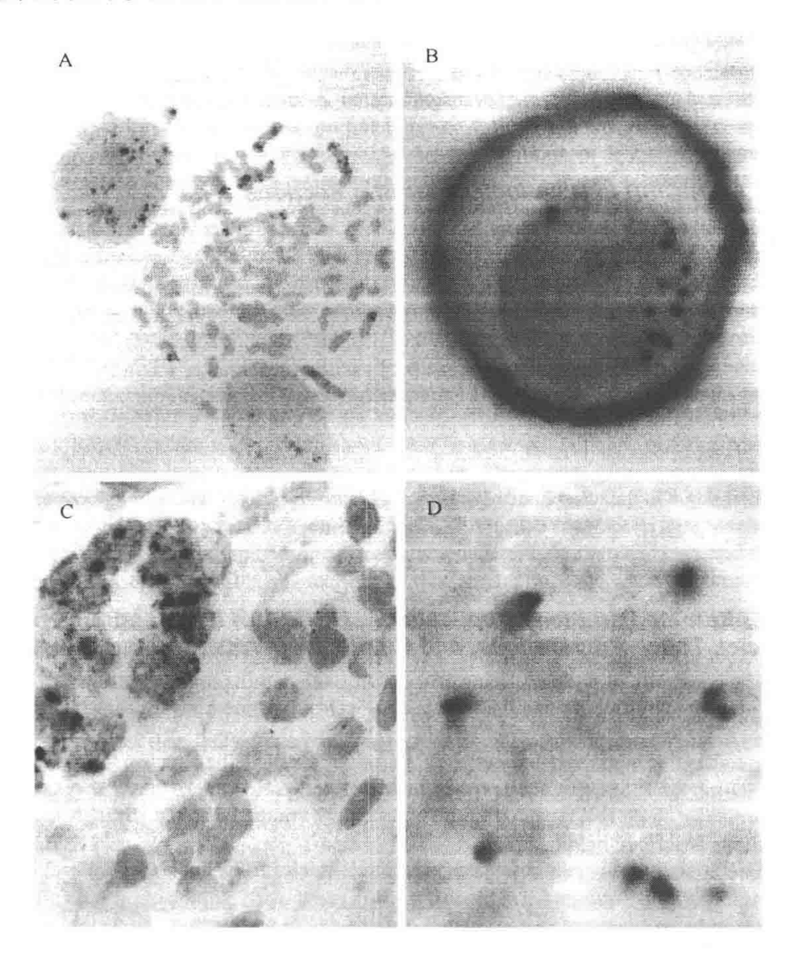


图 1 （A）用双色 FISH 分析乳腺癌细胞系 17 号染色体着丝粒（DAB）和 *ERBB2*（*HER2/NEU*）（深红色），表明 17 号染色体部分非整倍体和高水平 *ERB2* 扩增。（B）免疫组化和 CISH 共分析浸润性乳腺癌细胞块的 *ERBB2*（HER2/NEU）蛋白质（深红色）和基因组位点（*DAB*）。膜相关 *ERBB2* 强表达是由于高水平基因组扩增引起。（C）在神经母细胞瘤石蜡切片中高水平 *MYCN*（*N-myc*）基因组扩增。*MYCN* 扩增的异质性是明显的，在视野右侧部分的肿瘤细胞无扩增。（D）用双色 FISH 分析 Burkitt 淋巴瘤石蜡切片表明染色体 8q24 的易位导致 *MYC* 基因重排。相互邻近的红色和棕色信号对代表未发生重排的 8 号染色体，而独立的红色或棕色信号（右上角）代表易位染色体（见书后彩图）。

1.3 其他病理学应用：分解核、印片和细胞学制备的 FISH /CISH

通过几种不同方法中的任何一种都可以防止在薄石蜡切片中常有的核截断问题。这些方法除了本章所描述的，在文献中也有描述，并且摘要如下[5,6]。一般来说，所有这些方法都能用完整细胞评价 FISH 或 CISH 探针。然而，与本文描述的石蜡切片方法相比，它们都很少提供有关细胞类型和组织结构的信息。

一种方法是从厚的（一般为 25～50μm）石蜡切片中分解完整的细胞核[7]。该方法尤其适用于不必在自然构造条件下评价细胞时。然而，根据我们的经验，与在薄切片上杂交相比，技术操作并不简单。分解出细胞核所需要的酶处理有时则会损坏细胞核，并且与随后的玻片变性步骤相关。因此，有的标本将显示为核形态较差，且 FISH 或 CISH 信号也欠佳。完整的核也可以从新鲜或冰冻的组织标本中分离出来，一般来说这种方法的应用比从石蜡中分离更可靠一些[6]。

FISH 或 CISH 也可以在新鲜或解冻（冰冻）的组织切片上进行[6]。这些印片在杂交前需要酶的消化，否则标记的探针不易通过完整的细胞膜和细胞质进入其靶染色体区域。这种方法的优点是核是完整的，因此容易进行染色体缺失的评价。缺点是必要的酶处理会改变核的大小和形状，因此在不同细胞群体之间辨别其形态学特征可能较困难，如瘤细胞和非瘤细胞。

对于 FISH 和 CISH 来说，细胞学制备具有其独特的优点。像印片一样，它们提供了完整的核。然而，“细胞学”制备方法，包括某些专利技术［如 ThinPrep（Cytyc Corporation)］，标准化程序较高，有助于 FISH/CISH 的应用[6]。

2. 方法

2.1 杂交前的玻片处理

1. 4μm 石蜡切片，贴于 Superfrost/Plus（Fisher Scientific，Pittsburgh，PA）显微镜载玻片上。

2. 60℃烤箱。

3. 微波炉，JE1390GA（General Electric Co.，Louisville，NY）。

4. 载玻片盒，型号 240000（Boekel Scientific，Feasterville，PA）。

5. 玻璃染色缸。

6. Tris-EDTA 溶液：0.1mol/L Tris-HCl，40mmol/L EDTA，pH 7.0。溶解 24.2g Tris 碱和 29.22g EDTA 于 1800mL 去离子水中，用 10mol/L NaOH 调到 pH 7，定容至 2L。

7. 磷酸盐缓冲液（PBS）：137mmol/L NaCl，2.7mmol/L KCl，4.3mmol/L Na_2HPO_4，1.4mmol/L KH_2PO_4。溶解 8g NaCl、0.2g KCl、1.44g Na_2HPO_4 和 0.24g KH_2PO_4 于 900mL 去离子水中，定容至 1L。

8. Digest-All 3 (Zymed Laboratories，South San Francisco，CA)。

9. 10%福尔马林磷酸缓冲液（Fisher Scientific，Co.，Fair Lawn，NJ)。

10. 二甲苯。

11. 100%、85%和 70%乙醇。

2.2 变性和杂交

1. 用于载玻片的热循环仪，如 PTC-200/255（MJ Research Inc.，South San Francisco，CA)。

2. 37℃潮湿烤箱。

3. 塑料载玻片盒。

4. 玻璃盖玻片。

5. 橡皮泥。

6. 生物素和（或）地高辛标记的 DNA 探针，如 *Her2*、*C-Myc*、*N-Myc* (Zymed Laboratories)。

2.3 杂交后洗脱

1. 70～80℃水浴。

2. 玻璃染色缸。

3. 20×SSC：溶解 175.3g NaCl 和 88.2g 柠檬酸钠于 800mL 水中，定容至 1L，调 pH 7.0。

4. 2×SSC：混合 50mL 20×SSC 与 450mL 水中。

5. 0.5×SSC：加 10mL 2×SSC 到 30mL 水中。

6. PBS/T：加 250μL Tween-20 到 500mL PBS 中。

2.4 检测

2.4.1 FISH

1. CAS-block (Zymed Laboratories)。

2. 抗体稀释液：溶解 10g 冻干正常山羊血清于 100mL CAS-block 中。

3. 链霉亲和素，Alexa-594 conjugate（Molecular Probes，Eugene，OR)。

用抗体稀释液以 1∶500 稀释。

4. 抗地高辛-荧光素，Fab-fragment（Roche Diagnostics Co.，Indianapolis，IN）。用抗体稀释液以 1∶500 稀释。

5. PBS/T。

6. DAPI 封片介质（Vector Laboratories，Burlingame，CA）。

2.4.2 CISH

1. CAS-block（Zymed Laboratories）。

2. 抗体稀释液：溶解 10g 冻干正常山羊血清于 100mL CAS-block 中。

3. HRP-链霉亲和素（Zymed Laboratories），稀释好的以备使用。

4. 抗地高辛-AP，Fab-fragment（Roche Diagnostics Co.，Indianapolis，IN）。用抗体稀释液以 1∶500 稀释。

5. 抗地高辛-荧光素，Fab-fragment（Roche Diagnostics Co.，Indianapolis，IN）。用抗体稀释液以1∶500稀释。

6. 碱性磷酸酶抗荧光素（Vector Laboratories）。用抗体稀释液以 1∶500 稀释。

7. DAB 试剂盒（Zymed Laboratories）。按照操作说明书，于使用前配制。

8. Fast Red Substrate Pack（Zymed Laboratories）。按照操作说明书，于使用前配制。

9. 滤纸（0.45μm）（Fisher Scientific）。

10. PBS/T。

11. 苏木素（Vector Laboratories）。

12. 甘油凝胶（DAKO Co.，Carpinteria，CA）。

3. 方法

3.1 杂交前玻片处理

1. 于 60℃烤箱中烤片过夜。

2. 在二甲苯中脱蜡 3 次，每次 15min。

3. 100%乙醇脱水 3 次，每次 2 min，空气干燥。

4. 将盛有 Tris-EDTA 的塑料染色缸或其他用于微波炉盛水用的塑料容器，于微波炉中加热至 199℉。

5. 将玻片放入 Tris-EDTA 中，并继续于微波炉中 199℉加热 15min。

6. 取出玻片，放在 PBS 中。

7. 吸去玻片上多余的 PBS，然后放入 37℃潮湿的玻片盒内（或其他潮湿的

孵育盒内)。

8. 在玻片上加 100～500μL Digest-All 3，依据组织类型和固定情况消化处理 1～30min（见注释 1)。

9. 将玻片放入 PBS 中终止消化。

10. 在 10%福尔马林缓冲液中固定 1min，然后将玻片放在盛有 40mL PBS 的染色缸中轻洗一下，去除福尔马林。

11. 室温下，于 70%、85%和 100%乙醇中各 2min 脱水，空气干燥。

3.2 变性和杂交

1. 将足够的探针，如 10μL 加到组织切片上，适于 22mm×22mm 的盖玻片范围大小。

2. 将盖玻片盖到切片上，用橡皮泥封边。

3. 将玻片放到热循环仪的玻片槽内，于 94℃变性玻片 3min。

4. 将玻片转移到玻片盒内，将其放到潮湿的孵育箱中，于 37℃过夜。

3.3 杂交后洗脱

1. 依照每个染色缸内玻片的数量设置水浴的温度，1 张玻片为 73℃，2 张 74℃，3 张 75℃，4 张 76℃。

2. 将盛有 40mL 0.5×SSC 的染色缸放于水浴中，使缸内温度与水浴温度平衡。应在染色缸和内容物的温度不低于室温时，将其放入水浴。否则染色缸可能炸裂。用温度计确定最终温度。

3. 从玻片上去除橡皮泥和盖玻片。

4. 在 0.5×SSC 中洗脱玻片 5min。

5. 将玻片转移到室温下盛有 40mL 的 PBS/T 染色缸中。

3.4 检测

3.4.1 FISH

1. 去除玻片上多余的 PBS/T，将其放在潮湿的塑料玻片盒内。

2. 将 100～500μL CAS-block 抗体稀释液加到切片上，室温孵育 10min。

3. 轻轻蘸去 CAS-block，然后加 100～500μL 连接荧光的检测试剂，如 1∶500稀释的链霉亲和素-Alexa 594 和抗地高辛-荧光素。室温孵育 30min。

4. 室温下，玻片在 40mL PBS/T 中洗脱 3 次，每次 2min。

5. 用 DAPI 封片介质复染玻片。

3.4.2 CISH

1. 去除玻片上多余的 PBS/T，然后将其放到潮湿的塑料玻片盒中。

2. 在切片上加 CAS-block，室温下孵育 10min。

3. 轻轻蘸去 CAS-block，加 HRP-链霉亲和素，室温下孵育 30min。

4. 室温下，玻片在 40mL PBS/T 中洗脱 3 次，每次 2min。

5. 依照操作说明书指南制备 DAB 底物，去除玻片上多余的 PBS/T，用 DAB 孵育玻片 15min。

6. 室温下，玻片在 40mL PBS/T 中洗脱 3 次，每次 2min。

7. 去除玻片上多余的 PBS/T，加抗地高辛-荧光素（见注释 2），室温下孵育 30min。

8. 室温下，玻片在 40mL PBS/T 中洗脱 3 次，每次 2min。

9. 去除玻片上多余的 PBS/T，加碱性磷酸酶抗荧光素，室温下孵育 30min。

10. 室温下，玻片在 40mL PBS/T 中洗脱 3 次，每次 2min。

11. 依照操作说明书指南制备快红底物，用 0.45μm 滤膜过滤。

12. 流去/轻轻蘸去玻片上的 PBS/T，然后将快红底物加到切片上，孵育 30min，期间换两次快红底物，每隔 10min 换一次，即把玻片上的底物轻轻蘸去，再加上新过滤的底物。

13. 室温下，玻片在 40mL PBS/T 中洗脱。

14. 用苏木素复染玻片，请小心不要过度染色（见注释 3）。Gill's formula（非有机溶剂——见注释 4）应与快红联合使用。

15. 流水冲洗玻片数分钟，不要用柠檬酸氨增强苏木素的蓝色。

16. 在 50～75℃烤箱或水浴中加热甘油凝胶，滴一滴于切片上（不用有机溶剂），盖上盖玻片。轻压盖玻片以去除多余的甘油凝胶，如果甘油凝胶已经凝固，可以在热板（37～45℃）上加热玻片。

4. 注释

1. 残余的细胞外和细胞内蛋白质可引起淡的红-橙色之间的自发荧光，使 FISH 信号减弱，尤其当真的探针信号较弱时。通过增加石蜡切片的酶消化时间可以减小自发荧光。组织切片消化得不充分也将妨碍探针进入靶染色体区域（使“真”信号较弱），并且探针与非染色体细胞成分非特异的结合。因此，一般来讲，如果细胞形态仍非常好（基于 DAPI 复染）并且细胞有散在的小的非特异性信号的话，消化时间应增加。适当杂交的石蜡切片应具有保存完好的细胞形态（尽管不必非常好）、非常明显的探针信号以及无非特异性信号。

2. 此处的 CISH 检测程序是通过后续的用荧光素抗地高辛和碱性磷酸酶抗荧光素孵育实现地高辛标记探针的扩增。然而，地高辛标记的探针也可以不用扩增步骤来检测，此时则用碱性磷酸酶抗地高辛代替荧光素抗地高辛。

3. 与双色 FISH 的荧光素和罗丹明荧光相比，双色 CISH 的不同颜色间的区别不明显，当探针信号非常小的时候，辨别 DAB 与快红尤为困难。然而，常常可以通过上下调节切片的焦距来辨别染色。在准确的聚焦点上，快红或多或少有折射，红色很明显。苏木素复染以能够看见细胞核的最小量为宜，这也是很重要的。因此，苏木素应该仅是浅蓝色。否则，苏木素将遮盖与快红颜色相区别的 DAB。

4. 快红染色后不能用有机溶剂封盖玻片。尽管我们发现 CISH 玻片可以在室温下存放约数月，但 FISH 和 CISH 玻片常规上还是保存于 4℃。存放时 FISH 信号将部分淬灭，而 CISH 信号大约可以稳定 2 年。

5. 可以结合 CISH 和免疫组化染色，可以对双色 CISH 程序稍做修改(图 1)。这种情况下，可分别通过单色 CISH 和免疫组化检测一种染色体靶和一种蛋白质。

（曾　瑄 译，王明荣 校）

参考文献

1. Ross, J. S. and Fletcher, J. A. (1998) The HER-2/neu oncogene in breast cancer: prognostic factor, predictive factor, and target for therapy. *Stem Cells* **16,** 413–428.
2. Hopman, A. H., Claessen, S., and Speel, E. J. (1997) Multi-colour brightfield *in situ* hybridisation on tissue sections. *Histochem. Cell Biol.* **108,** 291–298.
3. Speel, E. J., Ramaekers, F. C., and Hopman, A. H. (1995) Cytochemical detection systems for *in situ* hybridization, and the combination with immunocytochemistry, 'who is still afraid of red, green and blue? *Histochem. J.* **27,** 833–858.
4. Tanner, M., Gancberg, D., Di Leo, A., Larsimont, D., Rouas, G., Piccart, M. J., and Isola, J. (2000) Chromogenic *in situ* hybridization: a practical alternative for fluorescence *in situ* hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. *Am. J. Pathol.* **157,** 1467–1472.
5. Davison, J. M., Morgan, T. W., Hsi, B. L., Xiao, S., and Fletcher, J. A. (1998) Subtracted, unique-sequence, *in situ* hybridization: experimental and diagnostic applications. *Am. J. Pathol.* **153,** 1401–1409.
6. Xiao, S., Renshaw, A. A., Cibas, E. S., Hudson, T. J., and Fletcher, J. A. (1995) Novel fluorescence *in situ* hybridization approaches in solid tumors: Characterization of frozen specimens, touch preparations, and cytologic preparations. *Am. J. Pathol.* **147,** 896–904.
7. Schofield, D. E. and Fletcher, J. A. (1992) Trisomy 12 in pediatric granulosa-stromal cell tumors. Demonstration by a modified method of fluorescence *in situ* hybridization on paraffin-embedded material. *Am. J. Pathol.* **141,** 1265–1269.

第 24 章　FISH 检测乳腺癌中 HER2 扩增

Rosemary E. Mueller Frances P. O'Malley

1. 引言

基因扩增经常在人肿瘤细胞中被检测到并在肿瘤发生中起重要的作用[1,2]。用比较基因组杂交对肿瘤细胞进行全基因组扫描，揭示出在实体肿瘤基因组的许多区域有基因拷贝数的改变[3]。对改变区域 DNA 的深入研究显示在实体瘤中复杂的 DNA 重排涉及多个基因并跨越几个 Mb。在染色体倍体变化中，经常伴有基因重排[4~6]。尽管研究 DNA 扩增区域有可能发现新的与肿瘤发生相关的基因，但在这些大的复杂重排中，邻近基因的共同扩增比较复杂。许多肿瘤显示 DNA 和染色体重排大量增加，因此有的学者认为肿瘤发生过程的关键事件是基因组不稳定性[7~10]，基因扩增只是结果。

1.1　乳腺癌中 *HER2* 基因的扩增

HER2 基因首先在化学诱导的大鼠神经母细胞瘤 DNA 中被发现[12]，命名为"*neu*"，人类相当于 *neu* 的基因从 cDNA 文库中克隆，由于与上皮生长因子受体同源，所以命名为"*HER2*"[13]。该基因也从基因组 DNA 中克隆出来，因为与引起鸟类有核红细胞增多症的病毒基因有关，故称为 *c-erbB2*[14, 15]。临床前实验数据显示 *HER2* 基因扩增通过发挥编码蛋白 p185 或 erbB2 的功能而直接导致肿瘤细胞生长。erbB2 蛋白与上皮生长因子受体相关，享有共同的大的糖基化胞外配基结合域、一个单独的疏水性跨膜域和一个包含酪氨酸激酶催化区域的细胞质域[16]。erbB2 蛋白当与其他 erbB 蛋白家族成员发生同源或异源二聚化时，参与信号转导网络[17]。激活的 erbB2 通过 MAPK 途径增强信号转导，使生长因子信号转换为调节间质-上皮的相互作用[18~21]。已经显示在鼠类乳腺上皮中 erbB2 信号转导影响形态学的分化[22,23]，在体外实验中诱导细胞迁移及向细胞外基质浸润[24]。

HER2 基因扩增导致 p185 蛋白过表达并发生于大约 1/3 的乳腺癌中[25~28]。就评估 *HER2* 改变方法的技术有效性而言，目前仍存在着未解决的问题[11]；就其临床有效性而言，*HER2* 基因扩增与淋巴结阳性（LNP）患者预后不良之间

的关系自 Slamon 首次报道以来不断得到证实[25～30]。评价淋巴结阴性（LNN）*HER2* 过表达的预后意义，尤其是以免疫组化进行检测，所获得的数据仍有争议；一些研究显示，与不良临床后果呈正相关[31～40]，而其他研究则显示无相关性[41～51]。免疫组化方面研究的综述见参考文献[52]。然而评价淋巴结阴性（LNN）*HER2* 基因扩增的研究一直显示出 *HER2* 基因扩增与不良预后之间的相关性。Press 等用荧光原位杂交（FISH）检测了一组 240 例未经治疗的 LNN 乳腺癌患者的 *HER2* 扩增情况[53]。在这些患者中，早期复发、复发、疾病所致死亡的相对风险与 *HER2* 扩增有关。进一步用定量 PCR 检测一组 580 名 LNN 患者 *HER2* 基因扩增的前瞻性研究，证实 *HER2* 基因 2 倍扩增的患者复发风险较高（$p=0.002$），具有统计学意义[54]。

1.2 *HER2* 过表达和乳腺癌治疗

已经证实 *HER2* 过表达是一个有效的乳腺癌预后因子。预后因子可以为肿瘤对某种药物或治疗的反应提供信息。*HER2* 的改变为辅助和转移的治疗都提供了预测信息。

几个随机控制实验提示，与 *HER2* 阴性的肿瘤患者相比，阳性患者对蒽环类为基础的化疗效果更佳。这些研究最初与检测 HER2 蛋白过表达有关[55～57]。1998 年，使用 Vysis PathVysion HER2 DNA 探针试剂盒以 FISH 方法对参加 CALGB 8869 临床试验和 Vysis PathVysion PMA 患者的 524 份肿瘤标本进行了回顾性分析[58]。所测标本的 FISH 分析结果显示，*HER2* 基因扩增的患者使用蒽环类抗生素化疗，呈现有意义的剂量-反应效应，而无 *HER2* 基因扩增者没有该效应。这一结果支持联邦食品与药品管理局（FDA）批准 Vysis PathVysion *HER2* DNA 探针试剂盒用于临床 II 期、淋巴结阳性乳腺癌患者。FISH 检测 *HER2* 基因扩增的明确实例显示于图 1A 和图 1B。

肿瘤的 HER2 状态能否预测患者对激素治疗的反应仍存有争议。Bianco 等报道了对参加那不勒斯大学研究组（GUN）试验的 I 期、II 期或 III 期（T3a）乳腺癌共 433 名妇女的研究结果[59]。在中位随访时间为 14 年中，三苯氧胺有效提高了无瘤生存期（DFS）（$p<0.00001$）和总生存期（OS）（$p=0.03$）。检测 *HER2* 与三苯氧胺的相互作用时发现，三苯氧胺只提高 *HER2* 阴性患者的 DFS 和 OS；而对于 *HER2* 阳性患者，竟出现负面作用[59]。在 2000 年的随访分析中证实了这些发现[60]。但是，其他的研究尚未证实这种 *HER2* 阳性与增高内分泌治疗反应性之间的相关性[61～63]。

Herceptin® （trastuzumab，Genentech，San Francisco，CA）是一种针对 HER2 蛋白的改良单克隆抗体，可通过干扰 HER2 蛋白在细胞表面启动的信号转导和启动抗体依赖性的细胞介导的细胞毒性作用而诱导肿瘤细胞的生长停滞。

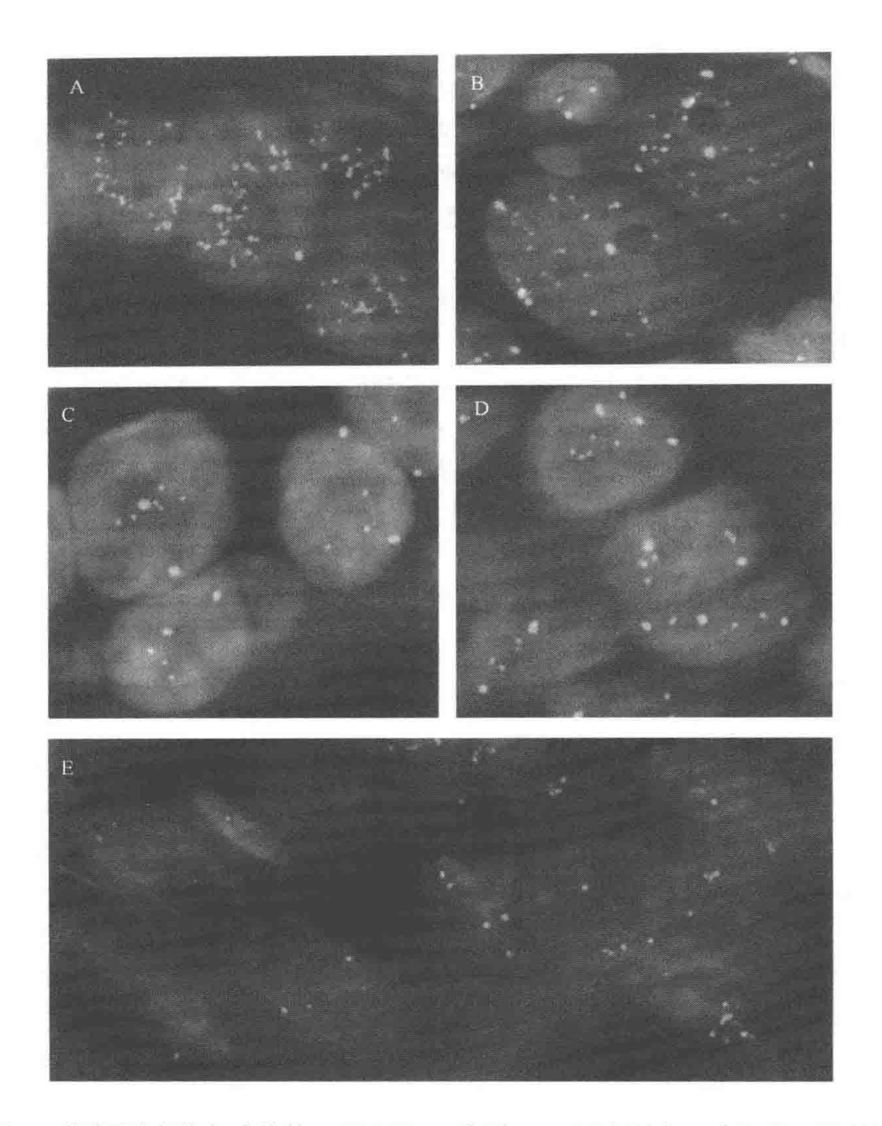


图 1 乳腺肿瘤间期细胞核的 HER2 FISH 检测。HER2 探针标记为红色，17 号染色体着丝粒探针标记为绿色（Path Vysion HER-2 DNA 探针试剂盒，Vysis，Downers Grove，IL）。用美国 Applied Imaging，Santa Clara，CA. 的 CytoVision 软件采集图像。（A）HER2 高度扩增，17 号染色体呈正常的双拷贝。（B）HER2 高度扩增，17 号染色体呈多拷贝。（C）HER2 多于双拷贝，17 号染色体呈正常的双拷贝。（D）每个细胞的 HER2 为 5 个拷贝，17 号染色体呈多体性。（E）肿瘤内异质性，DCIS 细胞有 HER2 扩增（右），浸润性肿瘤细胞无扩增（左）（见书后彩图）。

体外研究已经证实抗 HER2 抗体可以显著抑制产生大量 HER2 蛋白的肿瘤细胞的生长[64,65]。I 期和 II 期临床试验已证实 Herceptin® 单独使用或与顺铂联合使用都是安全有效的[66,67]。关键的 III 期临床试验显示 HER2 过表达的患者化疗同

时应用 Herceptin® 与延长肿瘤进展有关（中位数 7.4 月、4.6 月，$p<0.001$），而且 Herceptin® 作为一线治疗用于已转移的患者，一年的死亡率较低（22%、33%，$p=0.008$）。在此次试验中，患者肿瘤的 *HER2* 状态参照临床试验分析（CTA）进行免疫组化法分析。肿瘤分别评分为 0、1+、2+或 3+，只有 2+或 3+染色的患者符合研究条件（约占患者的 1/3）。结果提示只有 *HER2* 免疫组化强染色（3+）的患者组治疗有效[69,70]。1998 年美国食品与药品管理局（FDA）批准了 Dako HercepTest™ 用于免疫组化法检测患者肿瘤的 *HER2* 过表达，这些患者可考虑使用 Herceptin® 治疗。这一检测尚未在临床试验中直接应用；但是，与从国家肿瘤研究所乳腺癌组织库[69]中得到的 500 例乳腺肿瘤标本的 CTA 相比，其结果提示尽管 HercepTest™ 和 CTA 之间有 79% 的一致性，但 42% 的 HercepTest™ 为 2+的肿瘤其 CTA 为阴性（0 或 1+），因此不符合上述讨论的随机试验标准[70]。虽然 FDA 已经批准 HercepTest™ 广泛用于临床，然而几项研究已显示出免疫分析较高的假阳性[71~79]。对于考虑用 Herceptin® 治疗的患者，显然需要决定哪一种方法更适于评价 *HER2* 的状态。

1.3 FISH 分析 *HER2* 扩增

由于免疫组化（IHC）检测 *HER2* 状态的结果多变[52]，因而可以考虑使用 FISH 检测 DNA 拷贝数作为临床诊断实验。但是，由于 IHC 相对较便宜且方法较简洁，因此仍是诊断过程中最常使用的方法[80]。许多实验室建议采用 IHC 作为筛查手段，而 FISH 作为对 IHC 不能确诊病例进一步确诊的手段。比较 IHC 与 FISH 的结果时发现，当 IHC 诊断为强阳性或阴性时，二者结果有较高的一致性；但中间结果（HercepTest™ 评分为典型的 2+）显示与基因扩增的相关性较小[71~74,78]。有人建议 IHC 与基于 DNA 的分析之间的一些不一致的结果可解释为单拷贝 *HER2* 基因的过表达。然而，最近针对不一致病例的 *HER2* mRNA 表达水平的分析报道[79]反驳了这个论点。这一矛盾状况仍然在于与 FISH 分析显示出不一致性的中间 IHC 结果。这些标本可能是 17 号染色体多倍体或 17 号染色体为二倍体的细胞中 *HER2* 扩增水平为临界值（图 1C，D）。

用 FISH 分析确定的 *HER2* 基因拷贝数与 Southern 杂交和斑点杂交分析、定量 PCR 和比较基因组杂交（CGH）的结果是非常一致的[81,83~87]。当对肿瘤细胞进行显微切割富集了肿瘤细胞群体时，一致性得到提高[88]。FISH 分析可以对单个细胞在细胞水平上进行基因扩增状态评估，所以很容易地评价瘤内异质性。而 Southern 杂交、定量 PCR 和 CGH 分析都只能在大多数细胞出现同样改变的情况下检测出基因的改变。由于 FISH 可以在很少的或单个细胞上进行，因此对于乳腺癌组织活检材料来说是非常理想的。

活检标本及实体瘤的切除标本常规经福尔马林固定和石蜡包埋，随后切成组

织切片并贴附于载玻片上用于组织学检查。福尔马林固定石蜡包埋的组织标本可以保存数十年（见注释1）。由于DNA的稳定性，FISH很容易在存档的标本的组织切片上进行。保存组织结构是这一操作程序的主要优势。这使得我们能够评价浸润肿瘤部分的扩增状态，而不是图1E中的导管内癌或癌旁的癌前病变。FISH检测 *HER2* 扩增可用于细针穿刺的乳腺肿瘤标本[89～92]，新鲜组织印片[93]也是非常可靠的。与组织切片相比，解体的细胞核或细胞学涂片的FISH更宜使用自动图像分析。

2. 材料

2.1 实验室设备

1. 200mL二甲苯（或Hemo-D）3缸、200mL无水乙醇3缸置于通风橱(用于组织切片脱蜡)、合适的切片架。
2. 设为60℃的烤片机或电热板。
3. 两个水浴箱：分别设为81℃和37℃。
4. 12个塑料染缸。
5. 可吸取2～10μL、200～1000μL的微量加样器及吸头。
6. 可计秒的电子计时器。
7. 镊子。
8. 硅烷化的载玻片（Fisher Superfrost Plus）。
9. 22mm×22mm盖玻片。
10. Elmer橡皮泥。
11. 清洁透明的指甲油。
12. 配制溶液的标准实验室设备：温度计、天平、pH计、磁力搅拌器及搅拌棒、1～2L烧杯、量筒、用于储存溶液的洁净并可密封的500mL瓶。
13. Pyrex盘或带有可开合盖的塑料容器，加入温度计作为湿盒。
14. 温度准确的37℃温箱。

2.2 溶液、试剂

1. 0.2mol/L HCl溶液。
2. 1mol/L NaSCN溶液。
3. 20×SSC（3mol/L NaCl、0.3mol/L柠檬酸钠，pH 7.2）作为储存液以备稀释为2×SSC使用。
4. 含0.3% NP-40去污剂的2×SSC。

5. 去离子蒸馏水。

6. 胃蛋白酶（Sigma P6887，猪胃蛋白酶），每 50mL 0.2mol/L HCl 溶液有 72 000 个活性单位。

7. 中性福尔马林缓冲液。

8. 超纯甲酰胺：70%甲酰胺和 30%的 2×SSC 共 50mL。

9. 高纯度乙醇系列：70%、85%及 100%乙醇各 50mL。

10. 探针：Vysis PathVysion *HER2* DNA 探针试剂盒（30-161060）。

11. 4′,6-二氨基-2-苯基吲哚（DAPI-II 加抗淬灭剂）复染剂（Vysis，30-804840）。

2.3 显微镜

1. 可用透射光明视野及荧光（100W 汞灯照明）的显微镜。

2. 5×物镜、40×物镜，100×油镜。

3. 二色的滤光片（Chroma，德国）。

(1) 橙色：激发波长峰值（559±38)nm，发射波长峰值（558±48)nm。

(2) 绿色：激发波长峰值（509±31)nm，发射波长峰值（538±44)nm。

(3) 蓝色：激发波长峰值（367±61)nm，发射波长峰值（452±92)nm。

4. 荧光显微镜专用的镜油。

3. 方法

3.1 切片及制片

1. 从福尔马林固定石蜡包埋的组织块上切 4μm 厚组织切片，37℃水浴展片。

2. 贴在正含电荷的载玻片上。

3. 另连续切一张相应的组织切片，用苏木素和伊红（H&E）染色（见注释 2）。

3.2 脱蜡和浸透组织切片

1. 在 HE 切片上确认适当的肿瘤细胞位置（见注释 3）。

2. 检查切片组织的成分及固定质量（见注释 4）。

3. 烤箱或烤片器中烤片 60℃、2h（见注释 5）。

4. 将切片放入切片架，二甲苯 3 缸，每缸 5min，去除石蜡。过 3 遍无水乙

醇（见注释 6）。

5. 用烤片器或电热板 45℃、3min 干片。

6. 将切片放入室温下 50mL 0.2mol/L HCl 中 20min。

7. 50ml 蒸馏水洗片 1min，2×SSC 洗 2 次，每次 3min。

8. 放入 81℃ 的 1mol/L NaSCN 中，30min（见注释 7）。

9. 蒸馏水洗 1min，2×SSC 洗 2 次，每次 3min（见注释 8）。

10. 37℃于胃蛋白酶溶液中 3～10min（见注释 4 关于最佳时间的说明）。

11. 换新的 50mL 蒸馏水洗 1min，50mL 2×SSC 洗 2 次。

12. 45℃、3 min 干片。

13. 二次固定：室温下放至 10%中性福尔马林缓冲液中，10min（见注释 9）。

14. 2×SSC 洗 2 次，每次 3min。

15. 45℃、3min 干片（见注释 10）。

16. 放入 81℃水浴中的 70%甲酰胺/30% 2×SSC 溶液中 5min，使组织切片上的 DNA 变性。立刻连续放入 70%、85%和 100%乙醇中，每缸 1min（见注释 11）。

17. 45℃不超过 2min 干片。

3.3 杂交

1. 调暗室内灯光。

2. 用微量加样器取 10μL 探针溶液，呈线状滴加在盖玻片上（见注释 12）。

3. 将盖玻片盖在组织上，橡皮泥暂时封片。

4. 切片放入密闭湿盒（不能有水滴落），37℃、18h（过夜）。

3.4 杂交后洗脱

1. 设置 71℃水浴，加热 50mL 含 0.3% NP-40 清洁剂的 2×SSC。

2. 调暗灯光。

3. 从温箱中取出载玻片，用镊子剥去橡皮泥，室温下将载玻片浸入 2×SSC/0.3% NP 中数分钟（见注释 13）。

4. 将载玻片（一次不超过 4 张）放入加热（72℃）的 2×SSC/0.3% NP 中 2min。

5. 取出载玻片，迅速放入室温的 2×SSC，空气干燥。

6. 向盖玻片滴加 10μL DAPI，将载玻片盖在盖玻片上并翻转（见注释 14）。

7. 用指甲油将盖玻片的边封上。

8. 将玻片置于密闭的切片盒－20℃保存。

9. 用显微镜观察前玻片恢复至室温并擦去多余的水分。

3.5 分析

1. 在明视野显微镜的低倍物镜（10×或4×）下浏览 H&E 切片，找到想要研究的肿瘤细胞集中的区域（见注释15）。

2. 从不同视野中数60个肿瘤细胞（见注释16）。

3. 记下每个肿瘤细胞的红绿信号（见注释17～20）。

4. 注释

1. 我们曾用20年的蜡块成功地进行了 FISH。

2. 组织切片须由技术娴熟者用薄片切片机操作，始终保持切片方向一致。

3. 此步应在病理医师指导下进行。应核对组织样本以确定包含适当的浸润性肿瘤细胞。只有浸润性乳腺癌细胞可以计数。浸润性肿瘤细胞必须与出现在同一切片上的导管原位癌细胞、淋巴细胞、组织细胞、间质纤维细胞或脂肪细胞区别开来。如果你的计数包括2/2计数细胞或扩增的细胞，应再次检查以确定在计数肿瘤细胞时没有将正常的组织细胞（尤其是渗出的淋巴细胞）计入。

在低倍镜下扫描组织切片并标出肿瘤细胞区和标志物，有利于下一步定位 FISH 切片。标志物包括血管、脂肪组织区、正常导管区和 DCIS 区。分析 FISH 切片时要注意肿瘤内的异质性。注意任何不当的固定或组织变形（尤其当切片是冰冻切片时）都可能干扰判读。我们认为可以在 H&E 切片的盖玻片上用 Sharpie™ marker 笔画出肿瘤区域以供参考。

4. 蛋白酶处理的最佳时间取决于蜡块的年限，需要在进行 FISH 准备工作前了解组织成分和组织固定的质量。粗针穿刺的标本、含肿瘤细胞较少的切片和有大块坏死区域的组织要降低蛋白酶作用的时间。这些样本需要慎重对待以免过度消化。

5. 同时，向染缸加入 50mL 1mol/L NaSCN 并放入水浴箱，将温度调至81℃。

6. 此步应在通风橱中进行。这些溶液可用于许多载玻片并使用几个月直至变脏才更换。

7. 同时向染缸加入 50mL 0.2mol/L HCl 并放入37℃水浴，解冻一个包装的胃蛋白酶，于0.2mol/L HCl 中混匀。准备下列物品备用：混合 35mL 甲酰胺和 15mL 2×SSC，70%、85%及100%乙醇各 50mL。

8. 取出切片后，关掉水浴，直到染缸内的 70% 甲酰胺、30% 2×SSC 为 71℃。

9. 从长期储存的蜡块制备的切片（手术后 2～3 年以上）如果未进行第二次福尔马林固定，信号会较明亮。

10. 取出探针解冻，并确保 H&E 切片在旁边以供参考。

11. 如果使用 HyBrite chamber（VYSIS 30-144010），跳过 16 步和 17 步。

12. 将盖玻片放在洁净的棕色纸巾上置于工作台（醒目），手持载玻片，以组织切片的目标区域朝向探针，缓慢靠近直至接触到探针液体，迅速拿起并翻转载玻片，使盖玻片紧贴载玻片。探针溶液应在盖玻片下迅速扩散不形成气泡。用永久记号笔在载玻片上于盖玻片的上下角处画细线标记。

13. 盖玻片应在液体中滑脱或用镊子轻柔地揭去。这时的组织非常脆弱要注意不能刮伤。

14. 对较小的肿瘤细胞区域我们使用 5μL 探针及 18mm 盖玻片。VWR Scientific，目录号 48380046。

15. 找到任一标记物，然后转到 25 倍物镜。用荧光显微镜在 H&E 切片上找到目标区域并注意这些标记物的位置，在荧光光源下的形态特征。带着这个印象再在 25 倍物镜下观察 FISH 切片，并找到细胞的位置。找到肿瘤细胞的区域并记住周围组织结构的特征。换 100 倍物镜及油镜观察同一视野。肿瘤细胞中应不混有结缔组织，但仍像 H&E 切片所示成簇紧密排列。

16. 用三色滤光片（橙/绿/DAPI 蓝）可以看到细胞核完全蓝染，*HER2* 探针呈明亮的橙色光点，而 CEP17 探针呈绿色光点。为确定杂交过程正确与否可用 2/2 计数分析一些间质细胞或邻近的淋巴细胞核。寻找不重叠而且信号明亮、分散的肿瘤细胞。寻找有两个绿色信号的细胞并计数相应的红色信号。

17. 过度消化会导致肿瘤细胞离散或呈粗糙团块状，失去周围组织，如果出现这种情况，重复实验时要减少蛋白酶消化时间。固定过程不佳会导致“空心细胞”，组织结构虽然完整但是 DAPI 显色时会呈现黑色暗区。即使重复实验过程也不能弥补，只能仔细复习切片，在其他蜡块寻找保存最好的区域进行 FISH 。估计载玻片制备的技术质量，并以此来评价样本是真正的单体性或多体性，还是应该重复实验。

18. 通过单通道滤光片可以看见非常弱的信号，也就是用三色滤光片持续观察特定的细胞核，依次换黄色及绿色滤光片以确定在用三色滤光片下较弱的信号。

19. 如果 HE 切片或 IHC 染色切片显示组织有异质性，从每个区域选取 20 个细胞进行进一步分析。我们及其他研究者（Ridofi 等）已发表文章说明 DCIS 和浸润性肿瘤成分的实验结果是不同的（图 1E）。

20. 建议使用 Vysis 探针试剂盒收集每个细胞的红绿荧光信号信息。通过记录单个细胞可以评价异质性的程度和在样本中计数的分布。当所有数据以平均数形式给出时单个细胞的信息就不能体现。当评价低度或临界性扩增的病例时，这些信息就显得十分重要。

（韦　丽译，曾　瑄校）

参考文献

1. Schwab, M. and Amler, L. C. (1990) Amplification of cellular oncogenes: a predictor of clinical outcome in human cancer. *Genes Chromosom. Cancer* **1,** 181–193.
2. Schwab, M. (1998) Amplification of oncogenes in human cancer cells. *Bioessays* **20,** 473–479.
3. Tirkkonen, M., Tanner, M., Karhu, R., Kallioniemi, A., Isola, J., and Kallioniemi, O. P. (1998) Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH. *Genes Chromosome Cancer* **21,** 177–184.
4. Rennstam, K., Baldetorp, B., Kytola, S., Tanner, M., and Isola, J. (2001) Chromosomal rearrangements and oncogene amplification precede aneuploidization in the genetic evolution of breast cancer. *Cancer Res.* **61,** 1214–1219.
5. Jarvinen, T. A., Tanner, M., Barlund, M., Borg, A., and Isola, J. (1999) Characterization of topoisomerase II alpha gene amplification and deletion in breast cancer. *Genes Chromosom. Canc.* **26,** 142–150.
6. Walch, A., Specht, K., Bink, K., et al. (2001) Her-2/*neu* gene amplification, elevated mRNA expression, and protein overexpression in the metaplasia-dysplasia-adenocarcinoma sequence of Barrett's esophagus. *Lab. Invest.* **81,** 791–801.
7. Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1997) Genetic instability in colorectal cancers. *Nature* **386,** 623–627.
8. Pihan, G. A. and Doxsey, S. J. (1999) The mitotic machinery as a source of genetic instability in cancer. *Semin. Cancer Biol.* **9,** 289–302.
9. Duesberg, P., Rasnick, D., Li, R., Winters, L., Rausch, C., and Hehlmann, R. (1999) How aneuploidy may cause cancer and genetic instability. *Anticancer Res.* **19,** 4887–4906.
10. Li, R., Sonik, A., Stindl, R., Rasnick, D., and Duesberg, P. (2000) Aneuploidy vs. gene mutation hypothesis of cancer: recent study claims mutation but is found to support aneuploidy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97,** 3236–3241.
11. Fitzgibbons, P. L., Page, D. L., Weaver, D., et al. (2000) Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **124,** 966–978.
12. Shih, C., Padhy, L. C., Murray, M., and Weinberg, R. A. (1981) Transforming genes of carcinomas and neuroblastomas introduced into mouse fibroblasts. *Nature* **290,** 261–264.
13. Coussens, L., Yang-Feng, T. L., Liao, Y. C., et al. (1985) Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* **230,** 1132–1139.
14. Semba, K., Kamata, N., Toyoshima, K., and Yamamoto, T. (1985) A v-erbB-related protooncogene, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB-1/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82,** 6497–6501.
15. Schechter, A. L., Stern, D. F., Vaidyanathan, L., et al. (1984) The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature* **312,** 513–516.

16. Ullrich, A. and Schlessinger, J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell* **61,** 203–212.
17. Graus-Porta, D., Beerli, R. R., Daly, J. M., and Hynes, N. E. (1997) ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J.* **16,** 1647–1655.
18. Hynes, N. E. and Stern, D. F. (1994) The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **1198,** 165–184.
19. Tzahar, E. and Yarden, Y. (1998) The ErbB-2/HER2 oncogenic receptor of adenocarcinomas: from orphanhood to multiple stromal ligands. *Biochim. Biophys. Acta* **1377,** M25–M37.
20. Hackel, P. O., Zwick, E., Prenzel, N., and Ullrich, A. (1999) Epidermal growth factor receptors: critical mediators of multiple receptor pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11,** 184–189.
21. Yarden, Y. and Sliwkowski, M. X. (2001) Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2,** 127–137.
22. Niemann, C., Brinkmann, V., Spitzer, E., et al. (1998) Reconstitution of mammary gland development in vitro: requirement of c-met and c-erbB2 signaling for branching and alveolar morphogenesis. *J. Cell Biol.* **143,** 533–545.
23. Darcy, K. M., Zangani, D., Shea-Eaton, W., et al. (2000) Mammary fibroblasts stimulate growth, alveolar morphogenesis, and functional differentiation of normal rat mammary epithelial cells. *In Vitro Cell Dev. Bio. Anim.* **36,** 578–592.
24. Spencer, K. S., Graus-Porta, D., Leng, J., Hynes, N. E., and Klemke, R. L. (2000) ErbB2 is necessary for induction of carcinoma cell invasion by ErbB family receptor tyrosine kinases. *J. Cell Biol.* **148,** 385–397.
25. Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., and McGuire, W. L. (1987) Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* **235,** 177–182.
26. Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., et al. (1989) Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* **244,** 7 07–712.
27. Thor, A. D., Schwartz, L. H., Koerner, F. C., et al. (1989) Analysis of c-erb B-2 expression in breast carcinomas with clinical follow-up. *Cancer Res.* **49,** 7147–7152.
28. Kallioniemi, O. P., Kallioniemi, A., Kurisu, W., et al. (1992) ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence *in situ* hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89,** 5321–5325.
29. Paik, S., Hazan, R., Fisher, E. R., et al. (1990) Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project: prognostic significance of erbB-2 protein overexpression in primary breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **8,** 103–112.
30. Thor, A. D., Liu, S., Edgerton, S., et al. (2000) Activation (tyrosine phosphorylation) of ErbB-2 (HER-2/neu): a study of incidence and correlation with outcome in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **18,** 3230–3239.
31. Kallioniemi, O. P., Holli, K., Visakorpi, T., Koivula, T., Helin, H. H., and Isola, J. J. (1991) Association of c-erbB-2 protein over-expression with high rate of cell proliferation, increased risk of visceral metastasis and poor long-term survival in breast cancer. *Int. J. Cancer* **49,** 650–655.
32. Albanell, J., Bellmunt, J., Molina, R., et al. (1996) Node-negative breast cancers with p53 (–)/HER2–neu (–) status may identify women with very good prognosis. *Anticancer Res.* **16,** 1027–1032.
33. Giai, M., Roagna, R., Ponzone, R., De, B. M., Dati, C., and Sismondi, P. (1994) Prognostic and predictive relevance of c-erbB-2 and ras expression in node positive and negative breast cancer. *Anticancer Res.* **14,** 1441–1450.

34. Gusterson, B. A., Gelber, R. D., Goldhirsch, A., et al. (1992) Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *J. Clin. Oncol.* **10,** 1049–1056.
35. Marks, J. R., Humphrey, P. A., Wu, K., et al. (1994) Overexpression of p53 and HER-2/neu proteins as prognostic markers in early stage breast cancer. *Ann. Surg.* **219,** 332–341.
36. Press, M. F., Pike, M. C., Chazin, V. R., et al. (1993) Her-2/neu expression in node-negative breast cancer: direct tissue quantitation by computerized image analysis and association of overexpression with increased risk of recurrent disease. *Cancer Res.* **53,** 4960–4970.
37. Quenel, N., Wafflart, J., Bonichon, F., et al. (1995) The prognostic value of c-erbB2 in primary breast carcinomas: a study on 942 cases. *Breast Cancer Res. Treat.* **35,** 283–291.
38. Rilke, F., Colnaghi, M. I., Cascinelli, N., et al. (1991) Prognostic significance of HER-2/neu expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. *Int. J. Cancer* **49,** 44–49.
39. Seshadri, R., Firgaira, F. A., and Horsafall, D. J. (1993) Clinical significance of Her-2/neu oncogene amplification in primary breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **11,** 1936–1942.
40. Winstanley, J., Cooke, T., Murrary, G. D., et al. (1991) The long term prognostic significance of c-erb B-2 in primary breast cancer. *Br. J. Cancer* **63,** 447–450.
41. Allred, D. C., Clark, G. M., Molina, R., et al. (1992) Overexpression of HER-2/neu and its relationship with other prognostic factors change during the progression of in situ to invasive breast cancer. *Hum. Pathol.* **23,** 974–979.
42. Bianchi, S., Paglierani, M., Zampi, G., et al. (1993) Prognostic significance of c-erbB-2 expression in node negative breast cancer. *Br. J. Cancer* **67,** 625–629.
43. Borg, A., Tandon, A. K., Sigurdsson, H., et al. (1990) HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res.* **50,** 4332–4337.
44. Clark, G. M. and McGuire, W. L. (1991) Follow -up study of HER-2/neu amplification in primary breast cancer. *Cancer Res.* **51,** 944–948.
45. Lovekin, C., Ellis, I. O., Locker, A., et al. (1991) c-erb B-2 oncoprotein expression in primary and advanced breast cancer. *Br. J. Cancer* **63,** 439–443.
46. McCann, A. H., Dervan, P. A., O'Regan, M., et al. (1991) Prognostic significance of c-erbB-2 and estrogen receptor status in human breast cancer. *Cancer Res.* **51,** 3296–3303.
47. Noguchi, M., Koyasaki, N., Ohta, N., et al. (1992) C-erbB-2 oncoprotein expression versus internal mammary lymph node metastases as additional prognostic factors in patients with axillary lymph node-positive breast cancer. *Cancer* **69,** 2953–2960.
48. O'Reilly, S. M., Barnes, D. M., Camplejohn, R. S., Bartkova, J., Gregory, W. M., and Richards, M. A. (1991) The relationship between c-erbB-2 expression, S-phase fraction and prognosis in breast cancer. *Br. J. Cancer* **63,** 444–446.
49. Naldoni, C., Bruzzi, P., Bucchi, L., et al. (1990) Cohort Study of Women Affected by Gross Cystic Disease: Correlation between Cationic and Hormonal Composition of Breast Cyst Fluid and the Risk of Breast Cancer. In: *Ann. NY Acad. Sci.*, A. Angeli, et al., ed., pp. 272–275. The New York Academy of Sciences, New York.
50. Rosen, P. P., Lesser, M. L., Arroyo, C. D., Cranor, M., Borgen, P., and Norton, L. (1995) Immunohistochemical detection of HER2/neu in patients with axillary lymph node negative breast carcinoma. A study of epidemiologic risk factors, histologic features, and prognosis. *Cancer* **75,** 1320–1326.
51. Toikkanen, S., Helin, H., Isola, J., and Joensuu, H. (1992) Prognostic significance of HER-2 oncoprotein expression in breast cancer: a 30-year follow-up. *J. Clin. Oncol.* **10,** 1044–1048.
52. Ross, J. and Fletcher, J. A. (1999) The HER-2/neu oncogene: Prognostic factor, predictive

factor and target for therapy. *Semin. Cancer Biol.* **9,** 125–138.
53 Press, M. F., Bernstein, L., Thomas, P. A., et al. (1997) HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J. Clin. Oncol.* **15,** 2894–2904.
54. Andrulis, I. L., Bull, S. B., Blackstein, M. E., et al. (1998) neu/erbB-2 amplification identifies a poor-prognosis group of women with node-negative breast cancer. Toronto Breast Cancer Study Group. *J. Clin. Oncol.* **16,** 1340–1349.
55. Thor, A. D., Berry, D. A., Budman, D. R., et al. (1998) erbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **90,** 1346–1360.
56. Paik, S., Bryant, J., Park, C., Fisher, B., Tan-Chiu, E., Hyams, D., et al. (1998) erbB-2 and response to doxorubicin in patients with axillary lymph node- positive, hormone receptor-negative breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **90,** 1361–1370.
57. Paik, S., Bryant, J., Tan-Chiu, E., et al. (2000) Her2 and choice of adjuvant chemotherapy for invasive breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project protocol B-15. *J. Natl. Cancer Inst.* **92,** 1991–1998.
58. Muss, H. B., Thor, A. D., Berry, D. A., et al. (1994) c-erbB-2 expression and response to adjuvant therapy in women with node-positive early breast cancer [published erratum appears in *N. Engl. J. Med.* (1994) Jul; **331,** 211]. *N. Engl. J. Med.* **330,** 1260–1266.
59. Bianco, A. R., De Laurentils, M., Carlomagno, C., et al. (1998) 20 year update of the Naples GUN trial of adjuvant breasst cancer therapy: Evidence of interaction between C-erb-B2 expression and Tamoxifen efficacy. *Am. Soc. Clin. Oncol.* **17,** 97a-373.
60. Bianco, A., De Laurentiis, M., Carlomagno, C., Gallo, C., Panico, L., and De Torres, I. (2000) Overexpression predicts adjuvant Tamoxifen (TAM) failure for early breast cancer (EBC): Complete data at 20 year of the Naples GUN randomized trial. *Am. Soc. Clin. Oncol.* **17,** 97a-289.
61. Elledge, R. M., Green, S., Ciocca, D., et al. (1998) HER-2 expression and response to tamoxifen in estrogen receptor- positive breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. *Clin Cancer Res.* **4,** 7–12.
62. Soubeyran, I., Quenel, N., Coindre, J. M., et al. (1996) pS2 protein: a marker improving prediction of response to neoadjuvant tamoxifen in post-menopausal breast cancer patients. *Br. J. Cancer* **74,** 1120–1125.
63. Berry, D. A., Muss, H. B., Thor, A. D., et al. (2000) HER-2/neu and p53 expression versus tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive, node-positive breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **18,** 3471–3479.
64. Sliwkowski, M. X., Lofgren, J. A., Lewis, G. D., Hotaling, T. E., Fendly, B. M., and Fox, J. A. (1999) Nonclinical studies addressing the mechanism of action of trastuzumab (Herceptin). *Semin. Oncol.* **26,** 60–70.
65. Pegram, M. D., Lopez, A., Konecny, G., and Slamon, D. J. (2000) Trastuzumab and chemotherapeutics: drug interactions and synergies. *Semin. Oncol.* **27,** 21–25, 92–100.
66. Baselga, J., Tripathy, D., Mendelsohn, J., et al. (1996) Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti- p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **14,** 737–744.
67. Pegram, M. D., Pauletti, G., and Slamon, D. J. (1998) HER-2/neu as a predictive marker of response to breast cancer therapy. *Breast Cancer Res. Treat.* **52,** 65–77.
68. Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., et al. (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N.*

Engl. J. Med. **344,** 783–792.

69. Genentech Inc. (1998) *Herceptin (Trastuzumab) Package Insert.* (unpublished).
70. Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., et al. (1998) Addition of Herceptin™ (humanized anti-HER 2 antibody) as a single agent in 222 women with HER 2 overexpression who relapsed following chemotherapy for metastatic breast cancer (HER 2+/mbc) markedly increases anticancer activity: A randomized, multinational controlled phase III trial. *Proc Amer Soc Clin Oncol*, Abst #377.
71. Lebeau, A., Deimling, D., Kaltz, C., et al. (2001) Her-2/neu analysis in archival tissue samples of human breast cancer: comparison of immunohistochemistry and fluorescence *in situ* hybridization. *J. Clin. Oncol.* **19,** 354–363.
72. Kakar, S., Puangsuvan, N., Stevens, J. M., et al. (2000) HER-2/neu assessment in breast cancer by immunohistochemistry and fluorescence *in situ h*ybridization: comparison of results and correlation with survival. *Mol. Diagn.* **5,** 199–207.
73. Ridolfi, R. L., Jamehdor, M. R., and Arber, J. M. (2000) HER-2/neu testing in breast carcinoma: a combined immunohistochemical and fluorescence *in situ* hybridization approach. *Mod. Pathol.* **13,** 866–873.
74. Wang, S., Saboorian, M. H., Frenkel, E., Hynan, L., Gokaslan, S. T., and Ashfaq, R. (2000) Laboratory assessment of the status of Her-2/neu protein and oncogene in breast cancer specimens: comparison of immunohistochemistry assay with fluorescence *in situ* hybridization assays. *J. Clin. Pathol.* **53,** 374–381.
75. Farabegoli, F., Ceccarelli, C., Santini, D., et al. (1999) c-erbB-2 over-expression in amplified and non-amplified breast carcinoma samples. *Int. J. Cancer* **84,** 273–277.
76. O'Malley, F. P., Parkes, R., Latta, E., etal. (2001) Comparison of HER2/neu status assessed by quantitative polymerase chain reaction and immunohistochemistry. *Am. J. Clin. Pathol.* **115,** 504–511.
77. Jacobs, T. W., Gown, A., Yaziji, H., Barnes, M., and Schnitt, S. J. (1999) Specificity of HercepTest in determining HER-2/neu status of breast cancers using United States Food and Drug Administration-approved scoring system. *J. Clin. Oncol.* **17,** 1983–1987.
78. Hoang, M. P., Sahin, A. A., Ordonez, N. G., and Sneige, N. (2000) HER-2/neu gene amplification compared with HER-2/neu protein overexpression and interobserver reproducibility in invasive breast carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* **113,** 852–859.
79. Tubbs, R. R., Pettay, J. D., Roche, P. C., Stoler, M. H., Jenkins, R. B., and Grogan, T. M. (2001) Discrepancies in clinical laboratory testing of eligibility for trastuzumab therapy: apparent immunohistochemical false-positives do not get the message. *J. Clin. Oncol.* **19,** 2714–2721.
80. Jacobs, T. W., Gown, A., Yaziji, H., Barnes, M., and Schnitt, S. J. (1999) Comparison of fluorescence *in situ* hybridization and immunohistochemistry for the evaluation of HER-2/neu in breast cancer. *J. Clin. Oncol.* **17,** 1974–1982.
81. King, W., Proffitt, J., Morrison, L., Piper, J., Lane, D., and Seelig, S. (2001) The role of fluorescence *in situ* hybridization technologies in molecular diagnostics and disease management *Mol. Diagn.* **5,** 309–319.
82. Specht, K., Richter, T., Muller, U., Walch, A., Werner, M., and Hofler, H. (2001) Quantitative gene expression analysis in microdissected archival formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue. *Am. J. Pathol.* **158,** 419–429.
83. Wolf, N. G., Abdul-Karim, F. W., Farver, C., Schrock, E., Du, M. S., and Schwartz, S. (1999) Anaylsis of ovarian borderline tumors using comparative genomic hybridization and fluorescence *in situ* hybridization. *Genes Chromo. Cancer* **25,** 307–315.
84. Nicholson, J., Wickramasinghe, C., Ross, F., Crolla, J., and Ellison, D. Imbalances of

chromosome 17 in medulloblastomas detemined by comparative genomic hybridization and fluorescence *in situ* hybridization. *Mol. Pathol.* **53,** 313–319.

85. Collins, C., Volik, S., Kowbel, D., Ginzinger, D., Ylstra, B., Cloutier, T., Hawkins, T., Predki, P., Martin, C., Wernick, M., Kuo, W. L, Alberts, A., and Gray, J. W. (2001) Comprehensive genome sequence analysis of a breast cancer amplicon. *Genome Res.* **11,** 1034–1042.
86. Rummukainen, J., Kytola, S., Karhu, R., Farnebo, F., Larsson, C., and Isola, J. J. (2001) Aberrations of chromosome 8 in 16 breast cancer cell lines by comparative genomic hybridization, fluorescence *in situ* hybridization, and spectral karyotping. *Cancer Genet. Cytogenet.* **126,** 1–7.
87. Brecevic, L., Verdorfer, I., Saul, W., Trautmann, U., and Gebhart, E. (2001) The cytogenetic view of standard comparative genomic hybridization (CGH): deletions of 20q in human leukemia as a measure of the sensitivity of the technique. *Anticancer Res.* **21,** 89–92.
88. Lehmann, U., Glockner, S., Kleeberger, W., von Wasielewski, H. F., and Kreipe, H. (2000) Detection of gene amplification in arcival breast cancer specimens by laser-assisted microdissection and quantitative real-time polymerase chain reaction. *Am. J. Pathol.* **156,** 1855–1864.
89. Mezzelani, A., Alasio, L., Bartoli, C., Bonora, M. G., Pierotti, M. A., Rilke, F., and Pilotti, S. (1999) c-erbB2/neu and chromosome 17 analysis in breast cancer by FISH on archival cytological fine-needle aspirates. *Brit. J. Cancer* **80,** 519–525.
90. McManus, D. T., Patterson, A. H., Maxwell, P., Humphreys, M. W., and Anderson, N. H. (1999) Fluorescence *in situ* hybridization detection of erbB2 amplification in breast cancer fine needle aspirates. *Mol. Pathol.* **52,** 75–77.
91. Klijanienko, J., Couturier, J. Galut, M. El-Naggar, A. K., Maciorowski, Z., Padoy, E., Mosseri, V., and Vielh, P. (1999) Detection and quantitation by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) and image analysis of HER-2/neu gene amplication in breast cancer fine-needle samples. *Cancer* **87,** 312–318.
92. Sauter, G., Feichter, G., Torhorst, J., Moch, H., Novotna, H., Wagner, U., Durmuller, U., and Waldman, F. M. (1996) Fluorescence *in situ* hybridization for detecting erbB-2 amplification in breast tumor fine needle aspiration biopsies. *Acta Cytol.* **40,** 164–173.
93. Moore, J. G., To, V., Patel, S. J., and Sneige, N. (2000) HER-2/neu gene amplification in breast imprint cytology analyzed by fluorescence *in situ* hybridization: direct comparison with companion tissue sections. *Diagn. Cytopathol.* **23,** 299–302.

第 25 章　比较基因组杂交技术在肿瘤研究中的应用

Marjan M. Weiss, Mario A. J. A. Hermsen,
Gerrit A. Meijer, Paul J. van Diest

1. 引言

比较基因组杂交（CGH）可以提供肿瘤细胞全基因组染色体拷贝数改变的信息[1]。与常规细胞遗传学分析不同，CGH 无需细胞培养，因此只要是可以获得 DNA 的临床标本，包括存档的石蜡包埋组织，都可以进行该实验[2]。CGH 可以在正常染色体上定位扩增或缺失的 DNA 序列，从而显示出重要基因的位点。但是，CGH 由于自身分辨率的限制不能检测出亚染色体的改变，也不能检测染色体结构的改变，如染色体易位或倒位。由于上述特性，CGH 尤其适合筛查不同发展阶段的肿瘤，如癌前病变、浸润性癌及转移，指出在恶变早期启动阶

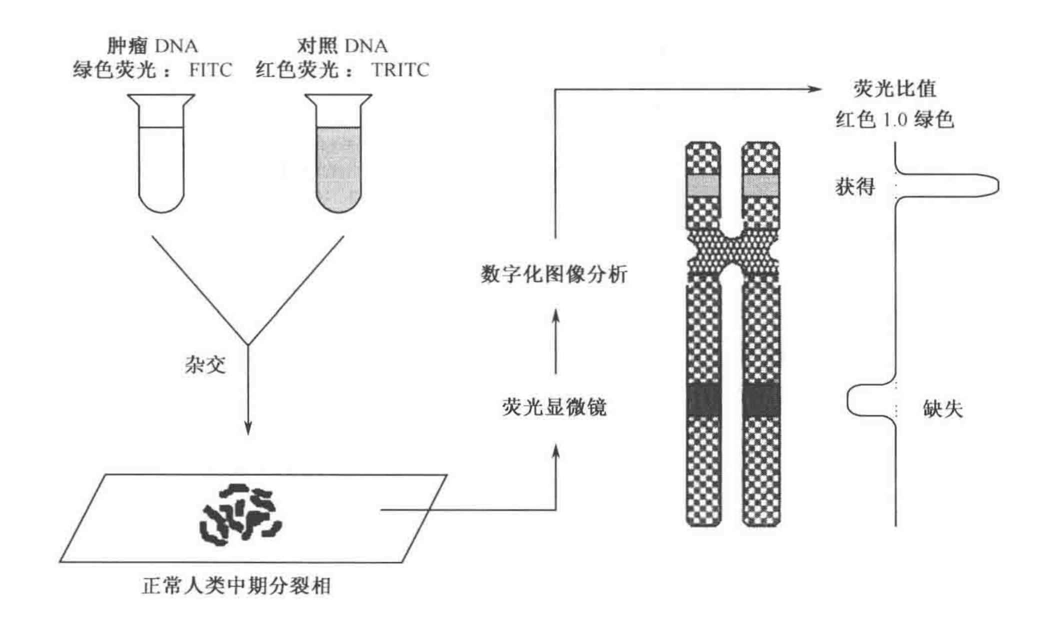


图 1　CGH 技术概略示意图。肿瘤和正常参照 DNA 分别标记绿色和红色荧光，杂交至正常中期染色体上。采集荧光信号图像，沿染色体轴量化每个染色体位点的绿色/红色信号比值。(经《人类病理学》授权使用)

段、肿瘤进展或转移过程中起重要作用的原癌基因或抑癌基因的位置。此外，CGH 可用于比较同一肿瘤中的不同组织成分，有助于更好地理解基因型和表型的关系；也可用于比较衍生细胞系与原始细胞系。

技术原理见图 1，用不同物质标记的正常 DNA 和肿瘤 DNA 与人类正常中期染色体杂交。使用荧光显微镜和数字图像处理系统，沿染色体轴得出正常 DNA 和肿瘤 DNA 二者的比值。数字图像处理包括以下步骤：①背景消除；②分离染色体，去除非染色体物质；③标化中期所有染色体的 FITC/TRITC 比值；④相互作用的染色体核型；⑤按比例将染色体调至标准长度。在特定的染色体区域，偏离正常值 1.0 表示肿瘤遗传物质的扩增或缺失，有时可在杂交中期染色体上红绿叠加的图像中观察到。但是，要获得充分的评价还要进行数字图像处理。最终结果称为相对拷贝数核型（图 2），显示出肿瘤中染色体拷贝数改变的概况。CGH 的灵敏度取决于肿瘤样本的纯度（见注释 1）；样本中混入正常细胞会降低灵敏度和内在分辨率。缺失的检出最低限是 10Mb，这相当于一个染色体

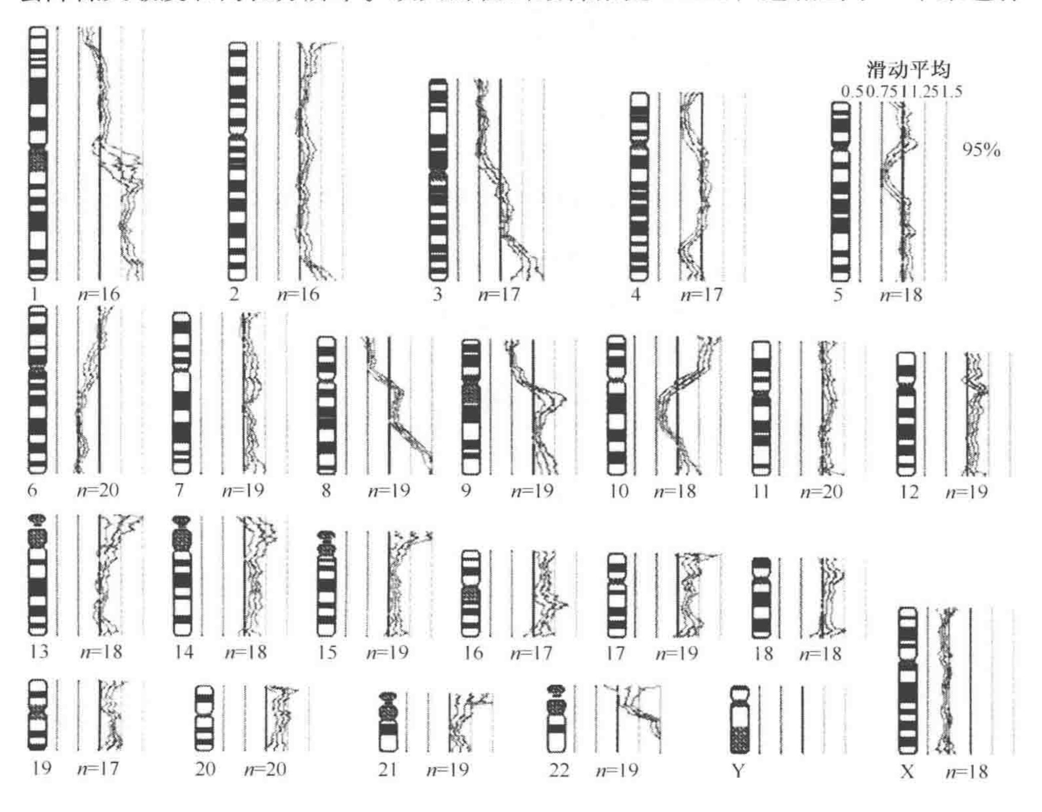


图 2　相对拷贝数染色体核型给出肿瘤的定量分析。多个中期染色体分裂相各染色体的平均绿色/红色荧光比值，结合 95%可信区间，与相应的染色体绘成图像。扩增的有 1p、2q、3q、7q、8q、9q、10p、14q、15q、16p/q、17p/q、19q、20q、21q 和 22q；缺失的有 1p、3p、4p、4q、5q、6q、8p、9p、10q 和 Xp/q。

条带的平均长度；而相对比较短的扩增片段（可短至 250kb）在拷贝数很高的情况下可检测到[3]（图 3）。CGH 操作必须包括以下步骤：正常中期染色体的制备、标记 DNA、杂交与洗脱、荧光显微镜观察、使用软件抓取和分析图像（包括核型分析）。肿瘤研究中 CGH 主要用于以下方面：筛查肿瘤遗传性畸变[4~16]、寻找特定肿瘤亚型的致癌相关基因[17]、分析实验模型中的肿瘤以获取肿瘤发展过程的更多信息[18]、诊断分类[17]及预后评估[19]。除了在肿瘤学方面的应用，CGH 还可用于分析胎儿及新生儿基因组范围内的染色体畸变[20~22]。近来芯片 CGH 技术的建立，使得 CGH 相关技术更有可能应用于常规诊断程序中（见注释 2）。

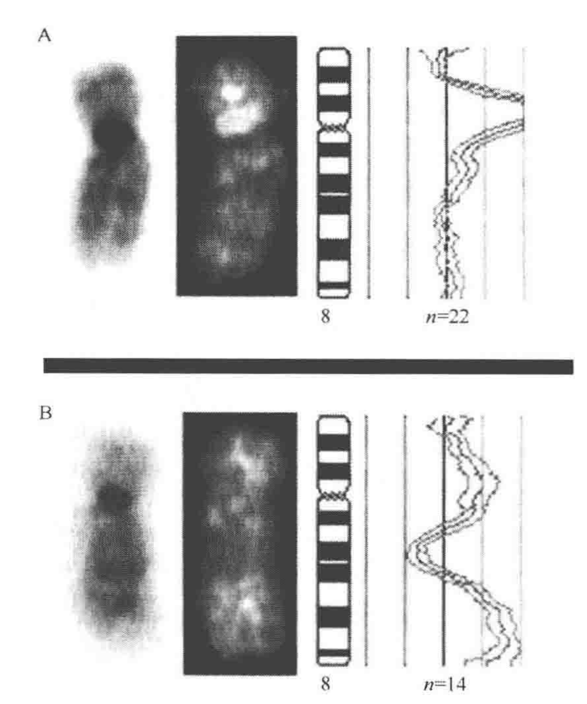


图 3　在染色体 8p11 小片段高度扩增的例子（A）。在染色体 8q21 有小的缺失（约 10Mb）的例子（B）。

2. 材料

1. Ham F10 培养基（Gibco-BRL，Life Technologies，Paisley，UK）。
2. 胎牛血清（FCS）（Gibco-BRL，Life Technologies）。
3. L-谷氨酰胺（Gibco-BRL，Life Technologies）。
4. 青霉素/链霉素（Gibco-BRL，Life Technologies）。

5. 植物血球凝集素（Gibco-BRL，Life Technologies）。

6. 秋水仙素（Gibco-BRL，Life Technologies）。

7. KCl（0.075mol/L）。

8. 甲醇：冰乙酸＝3：1。

9. DNA 聚合酶 I/DNase I（Gibco-BRL，Life Technologies）。

10. DNase I（Gibco-BRL，Life Technologies）。

11. dNTP 反应混合物：0.2mmol/L 的 dATP、dCTP、dGTP（Roche Diagnostics Nederland BV，Almere，the Netherlands）；500mmol/L Tris-HCl，pH 7.8；50mmol/L $MgCl_2$；100μmol/L 二硫苏糖醇；100μg/mL 牛血清白蛋白（BSA）。

12. dTTP：0.2 mmol/L（Roche Diagnostics）。

13. 生物素-16-dUTP（1nmol/μL）（Roche Diagnostics）。

14. 地高辛-11- dUTP（1nmol/μL）（Roche Diagnostics）。

15. 人 Cot-1 DNA（Roche Diagnostics）。

16. 无水乙醇。

17. 99.8%乙醇。

18. 3mol/L NaAC・$3H_2O$。

19. 杂交液：50% 去离子甲酰胺（*V/V*）、10% 硫酸葡聚糖、2×SSC pH 7.0。

20. 20×SSC：0.3mol/L 柠檬酸钠，3mol/L 氯化钠，pH 7.0。

21. 10×TN：1mol/L Tris-HCl，1.5mol/L NaCl，pH 7.5。

22. TNT：50mL 10×TN、450mL H_2O、1.25mL 20% Tween-20。

23. TNB：溶于 1×TN 中的 0.5%（*m/V*）封闭试剂（Roche Diagnostics）。

24. 亲和素-FITC：12.5μg/mL（Sigma-Aldrich，Poole，Dorset，UK）。

25. 羊抗地高辛-TRITC：4.0μg/mL（Roche Diagnostics）。

26. 抗淬灭剂：Vectashield（Vector，Peterborough，Cambridgeshire，UK）。

27. DAPI：350ng/mL 4′,6-二氨基-2-苯基吲哚溶于抗淬灭剂中。

3. 方法

3.1 中期染色体的制备

1. 将 1mL 肝素抗凝血与 9mL Ham F10 培养基（其中含 10% FCS、1% L-谷氨酰胺、1%青霉素/链霉素、1.5%植物血球凝集素）共同在 5% CO_2 37℃培养箱中培养 72h。

2. 用 0.1μg/mL 秋水仙素阻断细胞有丝分裂，作用 30min。

3. 150*g* 离心细胞 10min。弃上清。

4. 加入 10mL KCl 重悬细胞团块，室温下放置 20min。

5. 150*g* 离心 10min。弃上清。

6. 加入 10mL 甲醇：冰乙酸（3：1）固定细胞，注意小量缓慢加入并不断混匀。

7. 150*g* 离心 10min。弃上清。重复步骤 6。

8. 150*g* 离心 10min。弃上清。

9. 用约 1mL 甲醇：冰乙酸（3：1）重悬细胞。

10. 用巴斯德吸管取 1 或 2 滴细胞悬液，滴到乙醇处理过的载玻片上。

11. 立刻滴加数滴甲醇：冰乙酸（3：1）后固定标本。

12. 用相差显微镜检查中期染色体分裂相质量（见注释 3）。

13. 染色体标本在室温下过夜风干，可在－20℃干燥条件下保存。

3.2 DNA 标记

1. 将 1μg DNA、3μL dNTP、0.5μL dTTP、1μL 地高辛或生物素标记的 dUTP、3μL DNA 聚合酶 I/DNase I、0～1μL 稀释的 DNase I（调整浓度以获得理想的片段长度）混合。加 ddH_2O 至 30μL。

2. 在 15℃条件下孵育 1.5～2h。

3. 在 70℃条件下 15min 以灭活酶。

4. 通过 EB 染色的 1%（*m*/*V*）琼脂糖凝胶电泳观察 5μL 标记 DNA。

5. 用紫外透射反射仪观察 DNA 片段长度，最理想的 DNA 条带长度为 500～2000bp（见注释 4）。

3.3 杂交与洗脱

1. 混匀 10μL 标记肿瘤 DNA（常用生物素标记）、10μL 标记正常对照 DNA（常用地高辛标记）和 40μL 未标记的 Cot-1 DNA。

2. 在上述的样品中加入 0.1 倍体积的 3mol/L 乙酸钠和 2 倍体积的乙醇沉淀探针混合物，12 000*g* 离心 30min。

3. 弃上清并气干探针沉淀。

4. 用 6μL 杂交液溶解探针沉淀。

5. 将中期染色体标本在 72℃水浴中于 70%（*V*/*V*）甲酰胺/2×SSC 中变性 6min（见注释 5）。

6. 将变性的标本在梯度乙醇（70%、96%和 100%）中脱水。

7. 将 DNA 探针混合物在 80℃变性 10min。

8. 立即将 DNA 探针混合物滴加到中期染色体标本上。

9. 加盖玻片（18mm×18mm），用橡皮泥封片。

10. 在 40℃湿盒中杂交 2～3 天。

11. 小心揭去盖玻片。

12. 在室温条件下的 2×SSC 中洗 5min。

13. 在 45℃条件下的 0.1×SSC 中洗 3 次，每次 5min。

14. 在室温条件下的 TNT 中洗 5min。

15. 在标本上滴加 100μL TNB，加盖玻片（24mm × 50mm），预孵育 10min。

16. 在标本上滴加 100μL 含亲和素-FITC（1/200）和羊抗地高辛-TRITC（1/50）的 TNB 溶液，加盖玻片（24mm×50mm），置于湿盒中在 40℃孵育 60min（从此步骤起标本注意避光）。

17. 在室温条件下的 TNT 中洗 3 次，每次 5min。

18. 在室温条件下的 2×SSC 中洗 5min。

19. 标本在梯度乙醇（70%、96%和 100%）中脱水。

20. 在标本上滴加 25μL 含 DAPI 的抗淬灭剂，加盖玻片（24mm×50mm），橡皮泥封片。

3.4 荧光显微镜及图像分析

CGH 要求有三个单通道滤光片的荧光显微镜。DAPI（蓝色）用于识别染色体，FITC（绿色）用于识别杂交的肿瘤 DNA，TRITC（红色）用于观察杂交的正常 DNA。

1. 寻找红绿荧光信号均匀、背景低、分散良好的中期染色体分裂相（见注释 6）。每个中期染色体分裂相采集三张图（DAPI、FITC 和 TRITC）。

2. 用 8～12 个细胞中期染色体的平均比值与相应染色体绘图得出“相对拷贝数核型”（图 2）。偏离 1.0 的显著性最好结合 95%可信区间进行分析，95%可信区间根据平均比值绘出图像（见注释 7）。

4. 注释

1. 当使用组织切片从肿瘤细胞提取 DNA 时，混入正常细胞（间质或浸润淋巴细胞）会影响结果。当样本中的正常细胞超过 25%时，则要根据肿瘤的倍体决定是否必要采用显微切割技术[23]。显微切割可以手工操作也可以借助于先进的激光显微切割设备[24, 25]来完成。然而后者只能获取有限的细胞（即 DNA），必要时要进行通用 PCR 扩增[26, 27]。这些技术耗时、昂贵，而且实验人员必须进

行较好的对照实验以确保 CGH 结果的可靠性。另一种方法是进行细胞分选（如抗体连接磁珠法或流式细胞分选），可以选出（或分离出）肿瘤细胞或从样本中去除炎性细胞。

2. 新进展：目前多个实验室正在开展一项新技术——芯片 CGH。使用中期染色体进行杂交不能检测基因组中较小的片段（小于 10～20Mb）。芯片技术可以对基因组 DNA 拷贝数的改变进行更细致的研究，并可以使用 cDNA 分析基因表达情况。目前为止大多文献采用 cDNA 芯片进行研究[31～33]。最近，Pinkel 小组和 Albertson 小组发表了关于基因组 DNA 芯片的论文，描述一种测定位于 20 号染色体的一套克隆拷贝数荧光比值的方法。这一技术是为检测哺乳动物复杂基因组 DNA 序列的获得或丢失提供高分辨率的方法[34, 35]。芯片 CGH 可以对肿瘤遗传性畸变进行更精确地分析，并可对关键基因进行更精确地定位。另外，在临床应用性研究中可以确定特定疾病相关基因的状态。更加详细的讨论可见其他论著[36, 37]。

3. 用于 CGH 的高质量中期染色体标本应该满足以下几点：大量中期染色体、较少的细胞质残留（过多的细胞质会产生背景并影响变性效果）、最少的染色体重叠。此外，染色体要长度适当（400～550 条带）和不含分离的染色单体。最后，为了得到理想的带型，相差显微镜下观察到的染色体不要太亮应该发暗[28]。开始正式 CGH 实验之前要试用几批来自不同供者的染色体片子，因为它们的杂交效果会有很大差异。也可以选择商品化的制备好的染色体标本。然而在正式使用前仍需进行预试验，质量未必优于实验室自制的标本（如上所述的方法制备）。

4. 当生物素和地高辛标记的 dUTP 掺入到 DNA（间接标记）时，杂交后需要用荧光素耦合的抗体（分别用亲和素-FITC 或羊抗地高辛-TRITC）进行检测。荧光素直接耦合的 dUTP 在染色体上的杂交信号弱而均匀。肿瘤组织和正常组织 DNA 的标记片段长度应在同一范围内，限制在 500～2000bp。

5. 变性时间是可变的，应该根据每批制备的中期染色体进行调整。如果中期染色体标本变性时间过长，荧光信号会很强但是 DAPI 带型会很差，不能排出正确的核型。反之，如果标本变性不充分，DAPI 带型好、易辨认但荧光信号太弱且呈颗粒状。因此 CGH 实验的诀窍之一在于掌握二者的平衡。

6. CGH 实验中挑选好的中期染色体分裂相进行图像分析是至关重要的。整个中期染色体分裂相的荧光信号应该强而均匀。应注意避免出现较多的重叠染色体、过长或过短的染色体。背景要低，局部背景过强可能是残留的细胞质造成的。保持显微镜透视野的均一性是十分必要的，不一致会造成镜下的大批假象。而且，CGH 实验中如果 Cot-1 DNA 阻断效果良好，好的中期分裂相中着丝粒区会呈现为暗的区域。因为着丝粒区域包含的高度重复序列的长度存在很大的个体差异（因此在肿瘤和正常细胞之间也存在很大差异），会影响 CGH 结果的分析。

这些重复序列在全基因组范围内也都有不同程度的存在。Cot-1 DNA 阻断不充分会降低敏感性。

7. 目前有两种方法判断相对拷贝数核型分析的结果。一些研究者使用固定的比值限制，如 0.85/1.15 或 0.75/1.25，这取决于杂交的质量[29]。另一些学者更倾向于使用 95%可信区间，该方法考虑到了信号质量对结果的影响。根据后者的定义，偏离正常被解释为丢失或获得是指参照 95%可信区间，平均比值明显低于或高于 1.0。另外，1p32-pter、16p、19p/q 和 22q 的红绿荧光比值有时并不可靠，常会导致假阳性判断[30]。总的来说，如果只有低度的获得或丢失，这些染色体区域不会计入 CGH 曲线的判断。

（韦　丽 译，刘青杰 校）

参考文献

1. Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. P., Sudar, D., Rutovitz, D., Gray, J. W., Waldman, F., et al. (1992) Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science* **258,** 818–821.
2. Hermsen, M. A., Meijer, G. A., Baak, J. P., Joenje, H., and Walboomers, J. J. (1996) Comparative genomic hybridization: a new tool in cancer pathology. *Hum. Pathol.* **27,** 342–349.
3. Kallioniemi, A., Kallioniemi, O. P., Piper, J., Tanner, M., Stokke, T., Chen, L., et al. (1994) Detection and mapping of amplified DNA sequences in breast cancer by comparative genomic hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91,** 2156–2160.
4. Bentz, M., Dohner, H., and Huck, K. (1995) Comparative genomic hybridization in the investigation of myeloid leukemias. *Genes Chromosom. Cancer* **12,** 193–200.
5. Hermsen, M. A., Baak, J. P., Meijer, G. A., et al. (1998) Genetic analysis of 53 lymph node-negative breast carcinomas by CGH and relation to clinical, pathological, morphometric, and DNA cytometric prognostic factors. *J. Pathol.* **186,** 356–362.
6. Meijer, G. A., Hermsen, M. A. J. A., Baak, J. P. A. , et al. (1998) Progression from colorectal adenoma to carcinoma is associated with non-random chromosomal gains as detected by comparative genomic hybridisation. *J. Clin. Pathol.* **51,** 901–909.
7. Monni, O., Oinonen, R., Elonen, E., et al. (1998) Gain of 3q and deletion of 11q22 are frequent aberrations in mantle cell lymphoma. *Genes Chromosom. Canc.* **21,** 298–307.
8. Nupponen, N. N., Hyytinen, E. R., Kallioniemi, A. H., and Visakorpi, T. (1998) Genetic alterations in prostate cancer cell lines detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Genet. Cytogenet.* **101,** 53–57.
9. Ried, T., Knutzen, R., Steinbeck, R., Blegen, H., Schrock, E., Heselmeyer, K., et al. (1996) Comparative genomic hybridization reveals a specific pattern of chromosomal gains and losses during the genesis of colorectal tumors. *Genes Chromosom. Cancer* **15,** 234–245.
10. Riopel, M. A., Spellerberg, A., Griffin, C. A., and Perlman, E. J. (1998) Genetic analysis of ovarian germ cell tumors by comparative genomic hybridization. *Cancer Res.* **58,** 3105–3110.
11. Tarkkanen, M., Bohling, T., Gamberi, G., Ragazzini, P., Benassi, M. S., Kivioja, A., et al. (1998) Comparative genomic hybridization of low-grade central osteosarcoma. *Modern Pathol.* **11,** 421–426.
12. Tirkkonen, M., Tanner, M., Karhu, R., Kallioniemi, A., Isola, J., and Kallioniemi, O. P. (1998) Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH. *Genes Chromosom. Cancer* **21,** 177–184.

13. Weber, R. G., Scheer, M., and Born, I. A. (1998) Recurrent chromosomal imbalances detected in biopsy material from oral premalignant and malignant lesions by combined tissue microdissection, universal DNA amplification, and comparative genomic hybridization. *Am. J. Pathol.* **153,** 295–303.
14. Bastian, B. C., LeBoit, P. E., Hamm, H., Brocker, E. B., and Pinkel, D. (1998) Chromosomal gains and losses in primary cutaneous melanomas detected by comparative genomic hybridization. *Cancer Res.* **58,** 2170–2175.
15. Taguchi, T., Cheng, G. Z., Bell, D. W., Balsara, B., Liu, Z., Siegfried, J. M., et al. (1997) Combined chromosome microdissection and comparative genomic hybridization detect multiple sites of amplification DNA in a human lung carcinoma cell line. *Genes Chromosom. Cancer* **20,** 208–212.
16. Weber, R. G., Sommer, C., Albert, F. K., Kiessling, M., and Cremer, T. (1996) Clinically distinct subgroups of glioblastoma multiforme studied by comparative genomic hybridization. *Lab. Invest.* **74,** 108–119.
17. Simon, R., Burger, H., Brinkschmidt, C., Bocker, W., Hertle, L., and Terpe, H. J. (1998) Chromosomal aberrations associated with invasion in papillary superficial bladder cancer. *J. Pathol.* **185,** 345–351.
18. Tienari, J., Reima, I., Larramendy, M. L., Knuutila, S., von Boguslawsky, K., Kaartinen, M., et al. (1998) A cloned human germ cell tumor-derived cell line differentiating in culture. *Int. J. Cancer* **77,** 710–719.
19. Isola, J. J., Kallioniemi, O. P., Chu, L. W., Fuqua, S. A., Hilsenbeck, S. G., Osborne, C. K., et al. (1995) Genetic aberrations detected by comparative genomic hybridization predict outcome in node-negative breast cancer. *Am. J. Pathol.* **147,** 905–911.
20. Daniely, M., Aviram-Goldring, A., Barkai, G., and Goldman, B. (1998) Detection of chromosomal aberration in fetuses arising from recurrent spontaneous abortion by comparative genomic hybridization. *Hum. Reprod.* **13,** 805–809.
21. Wang, B. B., Yu, L. C., Peng, W., Falk, R. E., Williams, J., III (1995) Prenatal identification of i(Yp) by molecular cytogenetic analysis. *Prenat. Diagn.* **15,** 1115–1119.
22. Yu, L. C., Moore, D. H., Magrane, G., Cronin, J., Pinkel, D., Lebo, R. V., et al. (1997) Objective aneuploidy detection for fetal and neonatal screening using comparative genomic hybridization (CGH). *Cytometry* **28,** 191–197.
23. Weiss, M. M., Hermsen, M. A., Meijer, G. A., van Grieken, N. C., Baak, J. P., Kuipers, E. J., et al. (1999) Comparative genomic hybridisation. *Mol Pathol.* **52,** 243–251.
24. Zitzelsberger, H., Kulka, U., Lehmann, L., Walch, A., Smida, J., Aubele, M., et al. (1998) Genetic heterogeneity in a prostatic carcinoma and associated prostatic intraepithelial neoplasia as demonstrated by combined use of laser-microdissection, degenerate oligonucleotide primed PCR and comparative genomic hybridization. *Virchows Archiv.* **433,** 297–304.
25. Fend, F. and Raffeld, M. (2000) Laser capture microdissection in pathology. *J. Clin. Pathol.* **53,** 666–672.
26. Kuukasjarvi, T., Tanner, M., Pennanen, S., Karhu, R., Visakorpi, T., and Isola, J. (1997) Optimizing DOP-PCR for universal amplification of small DNA samples in comparative genomic hybridization. *Genes Chromosom. Cancer* **18,** 94–101.
27. Lucito, R., Nakimura, M., West, J. A., Han, Y., Chin, K., Jensen, K., et al. (1998) Genetic analysis using genomic representations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95,** 4487–4492.
28. Karhu, R., Kahkonen, M., Kuukasjarvi, T., Pennanen, S., Tirkkonen, M., and Kallioniemi, O. (1997) Quality control of CGH: impact of metaphase chromosomes and the dynamic range of hybridization. *Cytometry* **28,** 198–205.

29. Barth, T. F., Benner, A., Bentz, M., Dohner, H., Moller, P., and Lichter, P. (2000) Risk of false positive results in comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* **28,** 353–357.
30. Kallioniemi, O. P., Kallioniemi, A., Piper, J., Isola, J., Waldman, F. M., Gray, J. W., et al. (1994) Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sequence copy number changes in solid tumors. *Genes Chromosom. Cancer* **10,** 231–243.
31. Lu, J., Liu, Z., Xiong, M., Wang, Q., Wang, X., Yang, G., et al. (2001) Gene expression profile changes in initiation and progression of squamous cell carcinoma of esophagus. *Int. J. Cancer* **91,** 288–294.
32. Schena, M., Shalon, D., and Davis, R. W. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270,** 467–470.
33. Welsh, J. B., Zarrinkar, P. P., Sapinoso, L. M., Kern, S. G., Behling, C. A., Monk, B. J., et al. (2001) Analysis of gene expression profiles in normal and neoplastic ovarian tissue samples identifies candidate molecular markers of epithelial ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98,** 1176–1181.
34. Pinkel, D., Segraves, R., Sudar, D., Clark, S., Poole, I., Kowbel, D., et al. (1998) High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. *Nat. Genet.* **20,** 207–211.
35. Albertson, D. G., Ylstra, B., Segraves, R., Collins, C., Dairkee, S. H., Kowbel, D., et al. (2000) Quantitative mapping of amplicon structure by array CGH identifies CYP24 as a candidate oncogene. *Nat. Genet.* **25,** 144–146.
36. Snijders, A. M., Meijer, G. A., Brakenhoff, R. H., van den Brule, A. J., and van Diest, P. J. (2000) Microarray techniques in pathology: tool or toy? *Mol. Pathol.* **53,** 289–294.
37. Collins, F. S., Lander, E. S., and Southern, E. (1999) The chipping forecast. *Nat. Genet.* **21,** 1–60.

第26章 肿瘤细胞的荧光免疫表型和FISH共分析

Yanming Zhang, Brigitte Schlegelberger

1. 引言

染色体畸变通常在大多数血液肿瘤和各种实体瘤中检测到，在临床病理上，经常与判定肿瘤的直接形态和免疫表型特征有关。染色体畸变的检测为逐条诊断和肿瘤遗传分类奠定了基础[1~4]。尤其在白血病和淋巴瘤中，许多主要的染色体畸变与疾病的临床分期有关。另外，在肿瘤预后过程中，还将发生其他染色体的畸变。因此，细胞遗传学结果对预后估计和选择治疗方案有很大帮助[5,6]。

核型分析仍然是检测染色体数量和结构异常，如三体、单体、易位、缺失或倒位的主要标准。该技术可以一目了然地了解显微镜下观察到的染色体异常。荧光原位杂交（FISH）是检测染色体畸变的有力工具[7,8]。采用染色体特异性或位点特异性DNA探针，FISH不仅可以检测到中期细胞的染色体畸变，而且还能检测到间期细胞核的异常。免疫表型是病理实验室的常规诊断技术。白血病和淋巴瘤细胞表达特异的抗原，可以通过该技术识别肿瘤细胞的来源，追溯其来自正常分化过程的哪个阶段。

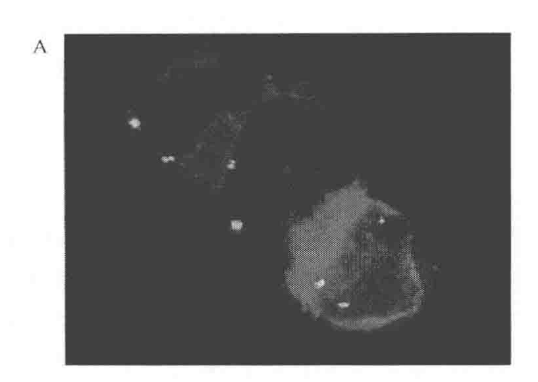
1.1 荧光免疫表型和FISH共分析的应用

荧光免疫表型和FISH共分析集中了两种技术的优点，在单个细胞水平上同时或依次分析肿瘤细胞的表型和基因型[9,10]。用细胞谱系和分化相关单克隆抗体进行免疫表型，用某种肿瘤已知染色体畸变的特异性DNA探针进行FISH实验，该技术使得对遗传异常和肿瘤细胞病变阶段进行比较并建立两者相关性成为可能，因此可以确定肿瘤细胞的世系和分化阶段[11,12]。该技术同样将基因拷贝数及其在同一细胞中蛋白质表达水平相关联[13]。该技术在临床和基础研究中的效力和可行性已经在白血病和淋巴瘤的许多研究中得到了广泛证实[9,14]。

1.1.1 定义肿瘤细胞谱系来源

细胞遗传学分析、Southern杂交、PCR经常用于检测染色体畸变或基因重排。然而，这些技术不能确定某些细胞群的遗传改变，因为它们破坏了细胞形态

或细胞表面抗原。荧光免疫表型和 FISH 共分析在检测染色体畸变或基因突变的同时确定细胞的免疫表型。采用该技术或类似技术的研究发现在骨髓及外骨髓增殖的疾病（MPD）及脑脊髓综合征（MDS）中，淋巴瘤细胞为骨髓来源细胞系[15～18]。在大多数急性骨髓白血病（AML）和急性淋巴白血病（ALL）中，染色体畸变限制在白血病未成熟细胞中[19～21]。使用 CD56 作为自然杀伤细胞的特异免疫表型标记物和 6q 缺失或 7 号三体作为遗传标记物，我们用荧光免疫表型和 FISH 共分析技术对三个患有白血病和自然杀伤细胞淋巴瘤的患者进行研究。在所有患者中，都能观察到这些染色体畸变局限于 CD56 阳性自然杀伤细胞群，而 CD3 阳性 T 淋巴细胞未出现染色体畸变（图 1A）。由此可知，自然杀伤细胞群和白血病来源于成熟自然杀伤细胞，而不是 T 淋巴细胞[22]。



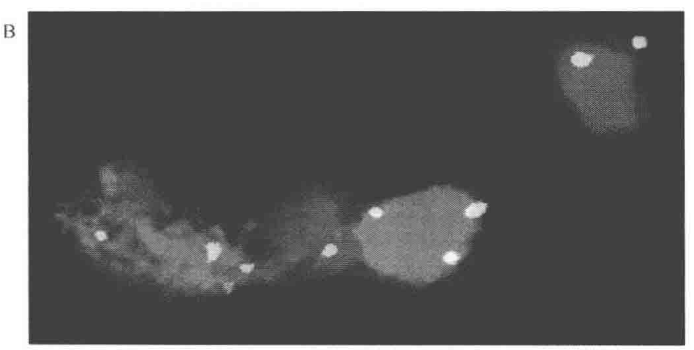


图 1　在自然杀伤细胞白血病中，进行荧光免疫表型和 FISH 共分析。（A）免疫表型用单克隆鼠抗人 CD56 识别自然杀伤细胞。鼠抗人 CD56 在 Cy3（红）滤光片下可以观察到。生物素标记 D7Z1 DNA 的 7 号染色体着丝粒探针，在 FITC 滤光片下可以观察到。CD56 阳性自然杀伤细胞显示出 3 个 D7Z1 杂交信号，为 7 号三体；而相邻的 CD56 阴性自然杀伤细胞只有 2 个正常的 D7Z1 信号。故自然杀伤细胞白血病的肿瘤克隆限制在 CD56 阳性自然杀伤细胞群中。（B）免疫表型实验中，单克隆鼠抗人 Ki-67 抗体在 Cy3（红）滤光片下可以观察到。生物素标记 7 号染色体着丝粒探针，在 FITC 滤光片下可以观察到。细胞用 DAPI（蓝）复染。两个细胞显示 3 个 D7Z1 杂交信号，说明为 7 号三体。这些肿瘤细胞也显示很强的鼠抗人 Ki-67 抗体荧光染色（红色），说明增殖水平很高。相邻的细胞只有 2 个正常 D7Z1 信号，鼠抗人 Ki-67 抗体荧光染色很低或阴性。故在自然杀伤细胞白血病和淋巴瘤中，染色体异常局限在 CD56 阳性肿瘤细胞群，而肿瘤细胞群比起正常细胞有较高的增殖水平。

1.1.2 确定肿瘤细胞分化阶段

任何肿瘤都是基因突变和染色体畸变积累的结果。一个关键的问题是定义细胞分化的哪一阶段发生这些遗传变化。荧光免疫表型和 FISH 共分析帮助确定了许多淋巴瘤和白血病中肿瘤细胞的分化阶段。通过应用该技术或改良的技术，发现一些患 MPD、MDS 和 AML 的患者为骨髓谱系的干细胞疾病，而另一些患者则为淋巴细胞谱系的干细胞疾病。在 CML 病例中，肿瘤细胞来源于能分化成骨髓细胞和淋巴细胞的干细胞[24～26]。在继发性和治疗相关白血病中，11q23 上的 *MLL* 基因通常涉及各种染色体易位。这些易位导致的畸变基因在白血病发病中起重要作用[1]。在三个治疗相关白血病患者中，我们运用荧光免疫表型（CD34 作为干细胞标记物）和 FISH（含有 *MLL* 基因的 YAC 探针）共分析技术，结果证实包括 *MLL* 基因的染色体易位发生在 CD34 阳性造血细胞中。因此，治疗相关白血病来源于造血祖先细胞或干细胞[12]。

1.1.3 提高 FISH 检测敏感性

一些肿瘤是由肿瘤细胞和正常细胞混合构成。在这样的病例中，很难达到染色体 FISH 方法进行染色体畸变检测的底线。假设肿瘤细胞中表达有一种抗原，它只在极少量的正常细胞中表达，荧光免疫表型和 FISH 共分析能够克服这些困难[7，8]。因为肿瘤细胞群可以通过应用相应的单克隆抗体识别，用 FISH 方法只对阳性染色的细胞的染色体畸变进行评估。这些评估局限于特定的细胞群中，周围的大多数正常细胞将被排除在分析之外。因此 FISH 检测染色体畸变的敏感性大大提高。例如，我们之前对 30 例何杰金病患者进行的研究中发现：典型 CD30 阳性细胞在何杰金病中通常只占总细胞的 1%～2%。只用 FISH 方法，百分率可能恰好甚至超过检测或定义染色体畸变的取舍点限制。采用荧光免疫表型和 FISH 共分析，我们发现只有 CD30 阳性 HRS 细胞含有许多染色体畸变，而 CD30 阴性淋巴结细胞只有正常数量的杂交信号[27]。这证明只有 CD30 阳性 HRS 细胞为肿瘤细胞。另外，假如肿瘤细胞免疫表型异于正常细胞的话，该技术可用于检测肿瘤细胞最小残留量以评估患者对治疗的反应。

1.1.4 基因拷贝数及其蛋白质表达水平的相关性

荧光免疫表型和 FISH 共分析可以在同一细胞水平比较基因拷贝数及其蛋白质的表达水平。在 6 例乳腺癌细胞系中应用该技术，在同一细胞中比较雌激素受体基因（*ESR*）拷贝数和雌激素受体（ER）的表达类型[13]。我们发现 *ESR* 缺失的肿瘤细胞的 ER 表达水平类似于未缺失的细胞；3～4 倍的 *ESR* 基因扩增的肿瘤细胞中 ER 的表达水平等同于含有两种常规 *ESR* 拷贝的细胞。因此，*ESR* 拷贝数并不直接与 ER 的表达相关，*ESR* 基因缺失的剂量效应并非乳腺癌中 ER

表达阴性的原因，或许有其他机制涉入而影响了 ER 的表达水平。

1.1.5 检测肿瘤细胞的增殖水平

一般来说，肿瘤细胞比正常细胞增殖得快，因此细胞分裂非常活跃。肿瘤细胞增殖水平的提高可能是某些病例具侵染性的原因[28]。荧光免疫表型和 FISH 共分析检测含有特定基因或染色体畸变的肿瘤细胞的增殖水平。采用 Ki-67 抗体作为细胞增殖标记物，我们应用该技术研究自然杀伤细胞白血病。我们发现以 7 号三体作为肿瘤克隆标记物的肿瘤细胞在免疫表型中高密度地被 Ki-67 荧光染色，而含有 2 条正常 7 号染色体的正常细胞的 Ki-67 荧光染色很弱或没有（图 1B)。因此，在自然杀伤细胞白血病中肿瘤细胞比正常细胞具有较高的增殖能力。

2. 材料

2.1 试剂

1. 单克隆鼠抗人抗体，如 CD4、CD8 和 CD56。
2. 人 Cot-1 DNA。
3. 人胎盘 DNA。
4. 硫酸葡聚糖。
5. Sephadex G-50 分离柱。
6. 超声破碎的鲑鱼精子 DNA。
7. 70%、85%和 100%乙醇。
8. 橡皮泥。
9. 去离子甲酰胺。
10. DAPI（4，6-二氨基-2-苯基吲哚)。
11. DABCO（2，2，2-三乙烯-1，4-二胺)。
12. 正常鼠血清。
13. 鼠单克隆抗地高辛抗体。
14. 鼠抗 FITC 抗体。
15. AMCA-亲和素。
16. FITC-亲和素。
17. 生物素化山羊抗亲和素抗体。
18. Cy3 标记的亲和素。
19. Cy3 标记的山羊抗鼠抗体。
20. Cy3 标记的兔抗山羊抗体。

21. Cy3 标记的驴抗兔抗体。

22. Cy3 标记的兔抗鼠抗体。

23. 地高辛标记的山羊抗鼠抗体。

24. FITC 标记的驴抗鼠抗体。

25. FITC 标记的山羊抗地高辛抗体。

2.2 缓冲液和溶液

1. PN 缓冲液：0.1mol/L NaH_2PO_4，0.1mol/L Na_2HPO_4，0.03% NaN_3（有毒），pH 8.0。

2. PNM 缓冲液：100mL PN 缓冲液中加入 5g 奶粉，50～60℃加热搅拌过夜直到完全溶解，4℃保存几个月或－20℃保存一年。

3. 20×SSC：3mol/L NaCl，0.3mol/L 柠檬酸钠，pH 7.0。

4. 抗淬灭剂：90mL 甘油、10mL PN 缓冲液中加入 0.23g DABCO；充分混匀。

5. DAPI 溶液：DAPI 溶解在 2×SSC 中至终浓度 0.2mg/mL，pH 7.0，4℃避光保存。

6. Carnoy 固定液：新鲜配制甲醇：冰乙酸（3：1），4℃保存。

7. 1%多聚甲醛：100mL 蒸馏水中加入 1g 多聚甲醛，调 pH 7.0，4℃保存 2 周。

8. 杂交液 I：60%甲酰胺，10%硫酸葡聚糖，1×SSC。

9. 杂交液 II：50%甲酰胺，10%硫酸葡聚糖，2×SSC。

3. 方法

3.1 标本制备

同时进行免疫表型和 FISH，可以使用细胞离心制片、涂片、印迹或冰冻切片。适当的操作和保护细胞完整是成功完成这部分实验的关键。一般来说，新鲜制备的标本片应该晾干过夜再转入－20℃或－80℃保存。低温下标本片可以保存数周甚至数年。自冰箱取出后，标本片应在室温下解冻，并晾干后再使用。使用前，应该在相差显微镜下检查细胞的形态和位置。下面是细胞离心制片的制作方法。

1. 将机体组织如淋巴结或实体瘤组织在 PBS 缓冲液中用剪或刀切成小块。

2. 收集得到细胞悬液。

3. 200*g* 离心 10min。

4. 弃去上清，PBS 重悬细胞。

5. 细胞计数。

6. 调节细胞浓度至 1×10^4 个/mL。

7. 取 200μL 细胞悬液加入细胞离心机，200g（800r/min）离心 5min。

8. 晾干标本片过夜或室温下放置至少 2h。

9. −20℃保存标本片。

3.2 免疫表型

根据需要解决的问题，进行一两次免疫表型实验。下面是两种实验方法。

3.2.1 单抗原的免疫表型

1. 将标本片自−20℃冰箱中取出，在室温下晾干 10min。

2. 将标本片于新鲜配制的丙酮中浸泡 10min，晾干。

3. PN 缓冲液漂洗标本片。

4. 与单克隆鼠抗体（如 CD4）孵育：100μL 鼠抗人 CD4 抗体（PNM 缓冲液稀释）加到标本片上，室温孵育 25min。根据抗体质量和细胞中抗原的表达水平，1∶50～1∶100 的比例稀释鼠抗人抗体（见注释 1）。

5. PN 缓冲液于室温下洗片 3 次，每次 5min。

6. 100μL Cy3 标记的山羊抗鼠抗体（PNM 缓冲液稀释 1∶200）于室温下孵育 25min。

7. PN 缓冲液于室温下洗片 3 次，每次 5min。

8. 100μL Cy3 标记的兔抗山羊抗体（PNM 缓冲液稀释 1∶200）于室温下孵育 25min。

9. PN 缓冲液于室温下洗片 3 次，每次 5min。

10. 100μL Cy3 标记的驴抗兔抗体（PNM 缓冲液稀释 1∶200）于室温下孵育 25min。

11. PN 缓冲液于室温下洗片 3 次，每次 5min。

12. 1%冰冷多聚甲醛固定细胞 1min（见注释 2）。

13. 在室温下 A. bidest 洗一次。

14. 在新鲜配制的 Carnoy 固定液中于 4℃洗片 10min（见注释 2）。

15. 在 A. bidest 中于室温下洗 2min。

在此步免疫表型结果可以在荧光显微镜下观察，PN 缓冲液封片，盖上玻璃盖片，镜下检测是否有相当数量的细胞发出荧光。如果没有，终止实验，用不同浓度的抗体进行对照实验。注意当标本片滴加 PN 缓冲液后细胞荧光亮度比较弱。不要长时间在镜下观看。

16. 70%、85%和100%梯度乙醇脱水，每次3min，晾干至少10min，预备进行FISH实验（见上述的3.3）。

3.2.2 双重免疫表型（如CD4和CD8）

3.2.2.1 第一抗原的免疫表型

1. 进行3.2.1的第1～3步。

2. 将100μL鼠抗人CD4抗体（1∶50～1∶100的比例PNM缓冲液稀释）加到标本片上，室温孵育25min（见注释3）。

3. 用PN缓冲液于室温下洗片3次，每次5min。

4. 将100μL Cy3标记的兔抗鼠抗体（PNM缓冲液稀释1∶200）室温下孵育25min。

5. 用PN缓冲液于室温下洗片3次，每次5min。

6. 将100μL Cy3标记的驴抗兔抗体（PNM缓冲液稀释1∶200）室温下孵育25min。

7. 用PN缓冲液于室温下洗片3次，每次5min。

8. 用20%正常鼠血清的PNM缓冲液于室温下孵育15min（孵育后不用洗片，直接进行3.2.2.2）（见注释4）。

3.2.2.2 第二抗原的免疫表型

1. 将100μL生物素标记的单克隆鼠抗人CD8抗体（PNM缓冲液1∶100稀释，含20%鼠血清）室温下孵育25min。

2. 用PN缓冲液于室温下洗片3次，每次5min。

3. 将PNM缓冲液1∶50稀释的AMCA标记的亲和素室温下孵育25min。

4. 用PN缓冲液于室温下洗片3次，每次5min。

5. 将PNM缓冲液1∶50稀释的生物素标记的山羊抗亲和素室温下孵育20min。

6. 用PN缓冲液于室温下洗片3次，每次5min。

7. 将PNM缓冲液1∶50稀释的AMCA标记的亲和素室温下孵育25min。为提高信号强度，可以重复步骤5～7。

8. 用1%冰冷多聚甲醛固定细胞1min。

9. 室温下A. bidest洗一次。

10. 在新鲜配制的Carnoy固定液中4℃洗片10min。

11. 在A. bidest中于室温下洗2min。

12. PN缓冲液封片，荧光显微镜下按3.2.1所描述的方法检测免疫表型。

13. 70%、85%和100%梯度乙醇脱水，每次3min，晾干至少10min，预备进行FISH实验。

3.3 FISH

3.3.1 DNA 探针制备

3.3.1.1 多拷贝探针

许多多拷贝探针已经商品化，如 Vysis。一般实验使用杂交 master mix I，但是如果是商品探针，建议按照生产商的说明书进行实验。

3.3.1.2 单拷贝或特异位点 DNA 探针

这些探针克隆在不同的载体（从噬菌体到 BAC、PAC、YAC）上。DNA 用生物素、地高辛或荧光染料标记后，探针离心缩小反应体积。杂交 master mix II 可用来溶解探针。一些商品探针，如涂染探针，也可以用这种方法。按生产商的建议进行探针制备，例如，自 Vysis 购买的 DNA 探针，1μL 直接标记探针应加入 2μL 去离子水和 7μL 提供的 CEP 杂交缓冲液。

3.3.1.3 DNA 标记

我们推荐使用 Life Technologies/Gibco 的 DNA 缺口平移标记试剂盒结合生物素、地高辛或荧光染料，如绿色或橙色进行 DNA 标记。每次反应，1μg DNA 探针在 15℃标记 1h。标记物经 Sephadex G-50 分离柱上样后离心。1%琼脂糖凝胶上样 5μL 缺口平移标记探针，检测探针片段的长度，长度应为 200～800bp，大部分在 300～600bp。

3.3.1.4 沉淀标记的 DNA 探针

1. 向 1.5mL Eppendorf 离心管中加入下述试剂，并在－70℃放置 30min：5～10μL标记 DNA、5μg 人 Cot-1 DNA、1μg 人胎盘 DNA、3μg 鲑鱼精子 DNA、1/10 体积的 3mol/L NaOAc（pH 5.2）和 2.5 倍体积的 100%乙醇。

2. 4℃下 13 000*g* 离心 30min。

3. 弃去上清，加入 2 倍体积的 70%乙醇溶解剩余的盐，13 000*g* 离心 10min。

4. 室温下晾干。

5. 10μL 杂交 master mix I 或 master mix II，混匀，溶解探针。

3.3.2 杂交

如果进行的是单抗原免疫表型，将进行双色 FISH（生物素和地高辛探针）。在双色 FISH 中，等量的地高辛和生物素探针一起沉淀，与细胞杂交。当进行的是双重免疫表型时，只要用地高辛探针进行一次 FISH 杂交即可（见注释 5）。

1. 2～3μL 含有 DNA 探针的杂交混合物滴加到杂交区域。

2. 盖上 12mm 盖片。

3. 橡皮泥封片，让其干燥。

4. 将标本片放在铺有湿纸巾的金属盒底，盖好金属盒，将其置于76℃水浴中5min（见注释6）。

5. 将金属盒转入37℃温箱。根据DNA探针的类型，选择杂交数小时、过夜或几天。重复序列探针，杂交只需要2h，而cDNA探针或染色体涂染探针，杂交则需要2天。

3.3.3 杂交后洗脱

1. 除去橡皮泥。

2. 将标本片在预热的0.1×SSC缓冲液（pH 7.0，60℃）中将盖片轻轻地滑掉（见注释7）。

3. 0.1×SSC洗片3次，每次5min。

4. 标本片在PN缓冲液中于室温下浸泡3min。

3.3.4 杂交信号的检测

下述实验方法用于检测双色探针（生物素和地高辛）。同时进行双重免疫表型和FISH时，只用地高辛探针杂交。检测生物素探针的抗体的步骤如AMCA-亲和素和生物素标记的山羊抗亲和素，可以省略（见注释5）。

1. 将AMC标记的亲和素和单克隆鼠抗地高辛抗体（分别用PNM缓冲液1∶100稀释）混合物室温下孵育25min。

2. 用PN缓冲液于室温下洗片3次，每次5min。

3. 将生物素标记的羊抗亲和素抗体和地高辛标记的羊抗鼠抗体（分别用PNM缓冲液1∶100稀释）混合物室温下孵育25min。

4. 用PN缓冲液于室温下洗片3次，每次5min。

5. 将AMC标记的亲和素和FITC标记的羊抗地高辛抗体（分别用PNM缓冲液1∶100稀释）室温下孵育25min。

6. 用PN缓冲液于室温下洗片3次，每次5min。

7. 用抗淬灭剂封片。如果实验中只有红绿荧光染料，封片前应将标本片在DAPI溶液中染2min，2×SSC漂洗。复染可以帮助确定杂交信号在细胞核中的位置。

3.4 图像保存和评估免疫表型和FISH结果

根据使用的单色、双色或三色荧光滤片系统，免疫表型和FISH结果可以同时或依次观察。结果可以用高速胶片（ASA400）或数字成像系统进行拍摄。对于免疫表型的结果，分辨真假信号是很重要的。一般来说，真信号明亮新鲜，而假信号则模糊微弱或者极其的明亮。FISH分析细胞的免疫表型，只能对完整的

没有重叠的细胞进行评估。我们一般一张标本可以分析至少 50 个阳性结果细胞和超过 100 个阴性结果细胞。比较重要的是，结果评估应该由另一个独立的观察者来完成。

4. 注释

1. 免疫表型实验中，单克隆鼠抗人 CD 抗体和多克隆 Cy3 和 AMCA 交联抗体都用 PNM 缓冲液以 1∶50～1∶200 的比例稀释。根据抗体质量和细胞中抗原表达水平确定适宜的抗体浓度。例如，在 T 淋巴细胞中高表达的 CD3 只需要与第一种或第一和第二种抗体孵育就可以轻易检测到。应该对每种新购买的抗体进行对照实验以确定其最适浓度。一般来说，Cy3 和 FITC 是强的可靠的染料，而 AMCA 比较弱，不稳定。Cy3 检测免疫表型的结果可以数周甚至数月后观察，而 AMCA 的信号很快淬灭。FITC 的标本片不能多日后检测，因为细胞的自发荧光将背景染色。

2. 免疫表型后再次固定，可以使用 1%或 4%的多聚甲醛。多聚甲醛可以在 4℃储存 2 周以上，而 Carnoy 固定液必须每次使用前新鲜配制。缓冲液的固定时间对于成功完成实验非常重要。细胞固定的时间越短，荧光信号损失的越多。然而太长的固定时间将导致 FISH 杂交效率的大幅度降低。

3. 免疫表型中，为排除错误的阴性结果，必须进行阴性对照实验。对照实验中任何荧光信号都应没有杂信号干扰。将单抗或基础抗体用水、PBS 或无关的同型抗体作为阴性对照。为排除干扰杂交或不同动物来源多克隆抗体的干扰，对照实验片应进行双重免疫表型实验。

4. 在双重免疫表型实验中，与含有高浓度鼠免疫球蛋白的 20%正常鼠血清孵育是成功进行第二次免疫表型的关键。兔抗鼠抗体的自由位点被封闭，不能与第二鼠抗人抗体（如 CD8）结合。这次孵育后不需要洗片。双重免疫表型细胞进行 FISH 杂交，不使用生物素标记的抗体，因为它们会与第二单克隆鼠抗人抗体非特异性结合。

5. 因为彩色荧光的限制，很难在一个实验中结合三种荧光颜色，如绿 FITC、红 Cy3、蓝 AMCA。事实上，蓝色的 AMCA 荧光非常弱，而且不稳定，只能用在重复序列探针上。另一方面，FITC 比 Cy3 信号强度降低得快，而且与背景的对比度将降低。因此，我们建议使用 Cy3 交联抗体检测表达量低的抗原或位置小的特异性 DNA 探针。

6. 我们没有发现分别变性和同时变性的细胞 DNA 和探针的结果有什么不同。许多实验室采用靶细胞 DNA 和探针 DNA 分别变性，随后 DNA 探针与人 Cot-1 DNA 进行预复性。我们认为同时变性比较快速简便，结果与分别变性差不多。

7. 在 FISH 研究中，我们发现在 0.1×SSC 中 60℃ 进行 3 次杂交后洗脱，其洗脱效率与 42℃ 50%甲酰胺/2×SSC 的差不多，而前者便宜、无毒。

致谢

本研究得到欧盟基金 QLG1-2000-00687 和德国肿瘤资助基金 10-1556-Sch14 的支持。

（陈 艳 译，王明荣 校）

参考文献

1. Rowley, J. D. (1998) The critical role of chromosome translocations in human leukemias. *Annu. Rev. Genet.* **32,** 495–519.
2. Rowley, J. D. (1999) The role of chromosome translocations in leukemogenesis. *Semin. Hematol.* **36,** 59–72.
3. Look, A. T. (1997) Oncogenic transcription factors in human acute leukemias. *Science* **278,** 1059–1064.
4. Heim, S. and Mitelman, F., eds. (1995) *Cancer Cytogenetics* Wiley-Liss, New York, NY
5. Rabbitts, T. H. (1994) Chromosomal translocations in human cancer. *Nature* **372,** 143–149.
6. Harris, N. L., Jaffe, E. S., Diebold, J., et al. (1999) World Health Organization classification of neoplastic disease of the hematopoietic and lymphoid tissue: Report of the clinical advisory committee meeting-Airlie House, Virginia, Nov. 1997. *J. Clin. Oncol.* **17,** 3835–3849.
7. Lichter, P., Tang, C. C., Call, K., et al. (1990) High resolution mapping of human chromosome 11 by *in situ* hybridization with cosmid clones. *Science* **247,** 64–69.
8. Pinkel, D., Straume, T., and Gray, J. W. (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83,** 2934–2938.
9. Weber-Matthiesen, K., Winkemann, M., Muller-Hermelink, A., Schlegelberger, B., and Grote, W. (1992) Simultaneous fluorescence immunophenotyping and interphase cytogenetics: a contribution to the characterization of tumor cells. *J. Histochem. Cytochem.* **40,** 171–175.
10. Knuutila, S., Alitalo, R., and Ruutu, T. (1993) Power of the MAC (Morphology Antibody Chromosomes) method in distinguishing reactive and clonal cells: report of a patient with acute lymphatic leukemia, eosinophilia and t(5;14). *Gene Chromosom. Cancer* **8,** 219–223.
11. Knuutila, S., Teerenhovi, L., Larramendy, M. L., et al. (1994) Cell lineage involvement of recurrent chromosomal abnormalities in hematologic neoplasms. *Gene Chromosom Cancer* **10,** 95–102.
12. Zhang, Y., Poetsch, M., Weber-Matthiesen, K., et al. (1996) Secondary acute leukaemias with 11q23 rearrangement: clinical, cytogenetic, FISH and FICTION studies. *Brit. J. Haematol.* **92,** 673–680.
13. Zhang, Y., Siebert, R., Matthiesen, P., et al. (2000) Feasibility of simultaneous fluorescence immunophenotyping and fluorescence in situ hybridization study for the detection of estrogen receptor expression and deletions of the estrogen receptor gene in breast carcinoma cell lines. *Virchows Arch.* **436,** 271–276.
14. Knuutila, S. (1997) Lineage specificity in hematological neoplasms. *Br. J. Hematol.* **96,** 2–11.
15. Fagioli, F., Cuneo, A., Bardi, A., et al. (1995) Heterogeneity of lineage involvement by trisomy 8 in myelodysplastic syndrome. *Cancer Genet. Cytogenet.* **82,** 116–122.
16. Gerritsen, W. R., Donohue, J., Bauman, J., et al. (1992) Clonal analysis of myelodysplastic syndrome: monosomy 7 is expressed in the myeloid lineage, but not in the lymphoid lin-

eage as detected by fluorescent *in situ* hybridization. *Blood* **80,** 217–224.
17. Kanfer, E. J., Price, C. M., Colman, S. M., and Barrett, A. J. (1992) Erythropoietin-independent colony growth in polycythaemia vera is not restricted to progenitor cells with trisomy of chromosome 8. *Br. J. Haematol.* **82,** 773–774.
18. Kibbelaar, R. E., van Kamp, H., Dreef, E. J., et al. (1992) Combined immunophenotyping and DNA in situ hybridization to syndromes. *Blood* **79,** 1823–1828.
19. Anastasi, J., Vardiman, J. W., Rudinsky, R., et al. (1991) Direct correlation of cytogenetic findings with cell morphology using in situ hybridization: an analysis of suspicious cells in bone marrow specimens of two patients completing therapy for acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **77,** 2456–2462.
20. El-Rifai, W., Larramendy, M. L., Ruutu, T. , and Knuutila, S. (1995) Lymphoid involvement in a patient with acute myeloid leukemia: a direct phenotypic and genotypic study of single cells. *Gene Chromosom. Cancer* **15,** 34–37.
21. Haase, D., Feuring-Buske, M., Konemann, S., et al. (1995) Evidence for malignant transformation in acute myeloid leukemia at the level of early hematopoietic stem cells by cytogenetic analysis of CD34 positive subpopulations. *Blood* **86,** 2906–2912.
22. Zhang, Y., Wong, K. F., Siebert, R., et al. (1999) Chromosome aberrations are restricted to the $CD56^+$, $CD3^-$ tumor cell population in natural killer cell lymphomas: A combined immunophenotyping and FISH study. *Br. J. Haematol.* **105,** 737–742.
23. Price, C. M., Kanfer, E. J., Colman, S. M., Westwood, N., Barrett, A. J., and Greaves, M. F. (1992) Simultaneous genotypic and immunophenotypic analysis of interphase cells using dual-color fluorescence: a demonstration of lineage involvement in polycythemia vera. *Blood* **80,** 1033–1038.
24. Jonas, D., Lubbert, M., Kawasaki, E. S., et al. (1992) Clonal analysis of bcr-abl rearrangement in T lymphocytes from patients with chronic myelogenous leukemia. *Blood* **79,** 1017–1023.
25. Clein, G. P. and Flemans, R. J. (1996) Involvement of the erythroid series in blastic crisis of chronic myeloid leukaemia: further evidence for the presence of Philadelphia chromosome in erythroblasts. *Br. J. Haematol.* **12,** 754–758.
26. Fauser, A. A., Kanz, L., Bross, K. J., and Lohr, G. W. (1995) T cells and probably B cells arise from the malignant clone in chronic myelogenous leukemia. *J. Clin. Invest.* **75,** 1080–1082.
27. Weber-Matthiesen, K., Deerberg, J., Poetsch, M., Grote, W., and Schlegelberger, B. (1995) Numerical chromosome aberrations are present within the CD30–positive Hodgkin and Reed-Sternberg cells in 100% of analysed cases of Hodgkin´s disease. *Blood* **86,** 1464–1468.
28. Wong, K. F., Zhang, Y., and Chan, J. K. F. (1999) Cytogenetic abnormalities in natural killer cell lymphoma/leukemia—Is there a consistent pattern? *Leukemia Lymphoma* **34,** 241–250.

第 27 章　用于分子细胞遗传学的人工细菌染色体资源库

Xiao-Ning Chen，Julie R. Korenberg

1. 引言

人类基因组测序的主要载体人工细菌染色体（BAC），是整合 DNA 序列和细胞遗传标志的理想材料。BAC 也适用 FISH 分析，因为 BAC 以一种稳定的，易于操作的克隆 DNA 的形式存在，能够与中期染色体和间期细胞核结合，产生明亮的、位置确定的信号[1]。为了将人类基因组 DNA 序列与在染色体上的确切位置相联系，我们采用 FISH、PCR 和测序法建立了 BAC 资源库。BAC 资源库包括 6000 个随机定位的 BAC 克隆，其中 1021 个 BAC-STS 对代表 957 个 BAC（图 1）。BAC 资源库可用于快速确定遗传性疾患和肿瘤中常见的因染色体重排而影响到的基因。经过初步的发展，国际合作收集整理的 BAC 克隆资源库共 7600 个克隆；这些 BAC 克隆既有 STS 标志，也是经 FISH 技术定位于染色体特定区带上的[2]（见注释 1）。

在过去的 10 年中，FISH 发展成为一种广泛应用于全世界临床和研究实验室的实验方法，可以同时检测不同染色体的同源性区域，为基因组交换、复制、重排的进化史的研究提供了突破口[1,2]。尤其是可采用复杂 DNA 探针与特定中期染色体和间期细胞核进行杂交，使得 FISH 成为临床和基础研究中必不可少的研究工具[3~6]。然而，因为缺乏高质量、可覆盖全基因组的 DNA 探针，FISH 技术的应用一直存在局限性。随着 BAC 资源库的开发，这种困境就可迎刃而解了[1,2]。

下面我们将详述具体的实验步骤，以及应用 BAC 资源库解决传统细胞遗传学方法不能解决的问题的实际例子，如肿瘤遗传学和与生殖有关的非整倍体的分析（见注释 2～4）。

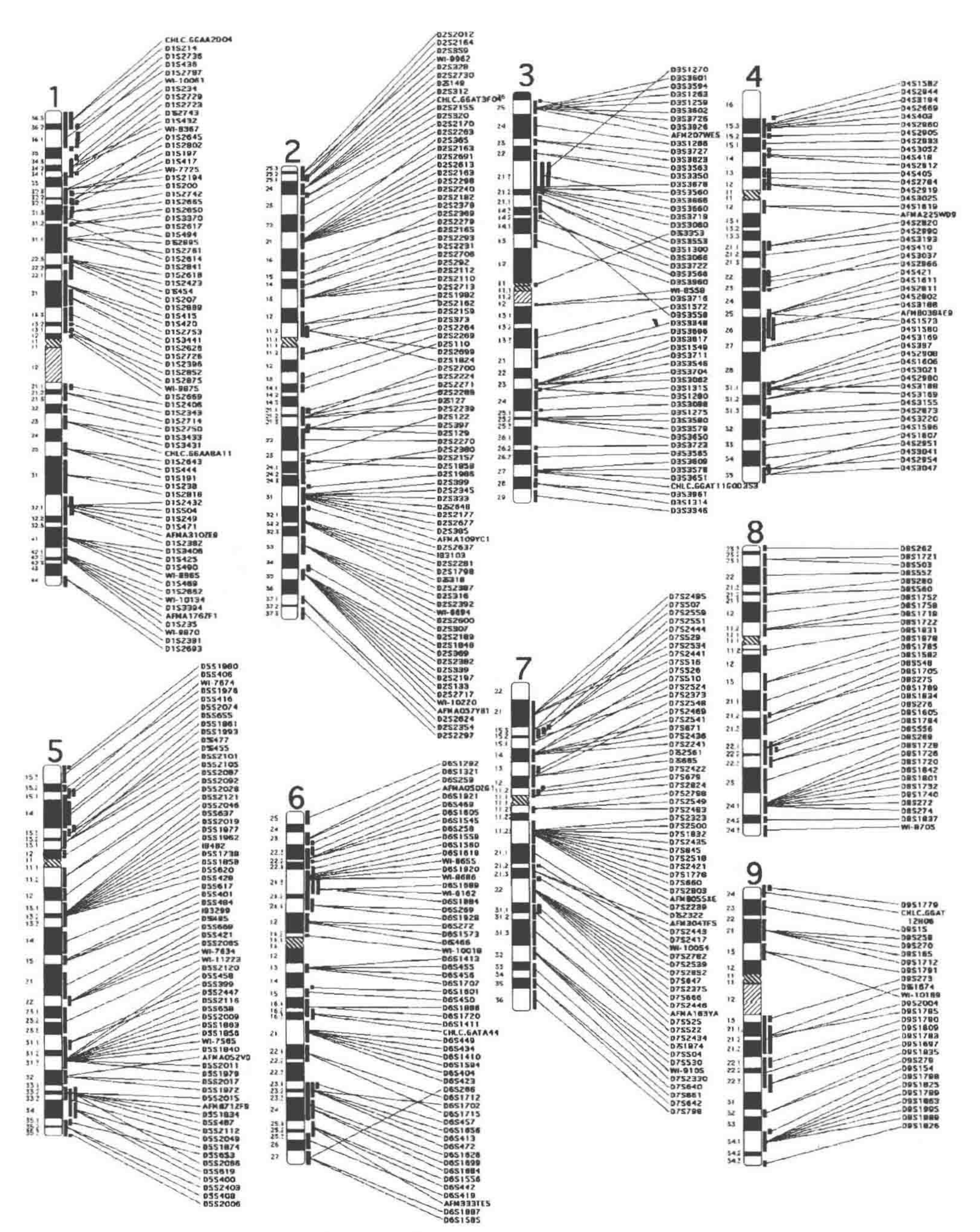


图 1　用 FISH 和 PCR 方法将染色体位置和基因组中的 DNA 序列对应而建立的整合 BAC 资源库[1]。此图谱包含总共 1021 个 BAC-STS 对，代表 975 个 BAC 克隆，在每条染色体模式图右边的垂直线表示克隆的染色体定位。线的长度表示定位的分辨率，也就是用描述的 FISH 方法将 BAC 信号定位于在线的外部边沿内部。虽然从我们的存档图像中可获得更高的分辨率，但在单一条带内，BAC 克隆也是按照遗传图谱和 RH 图谱的顺序排列[1,16]。

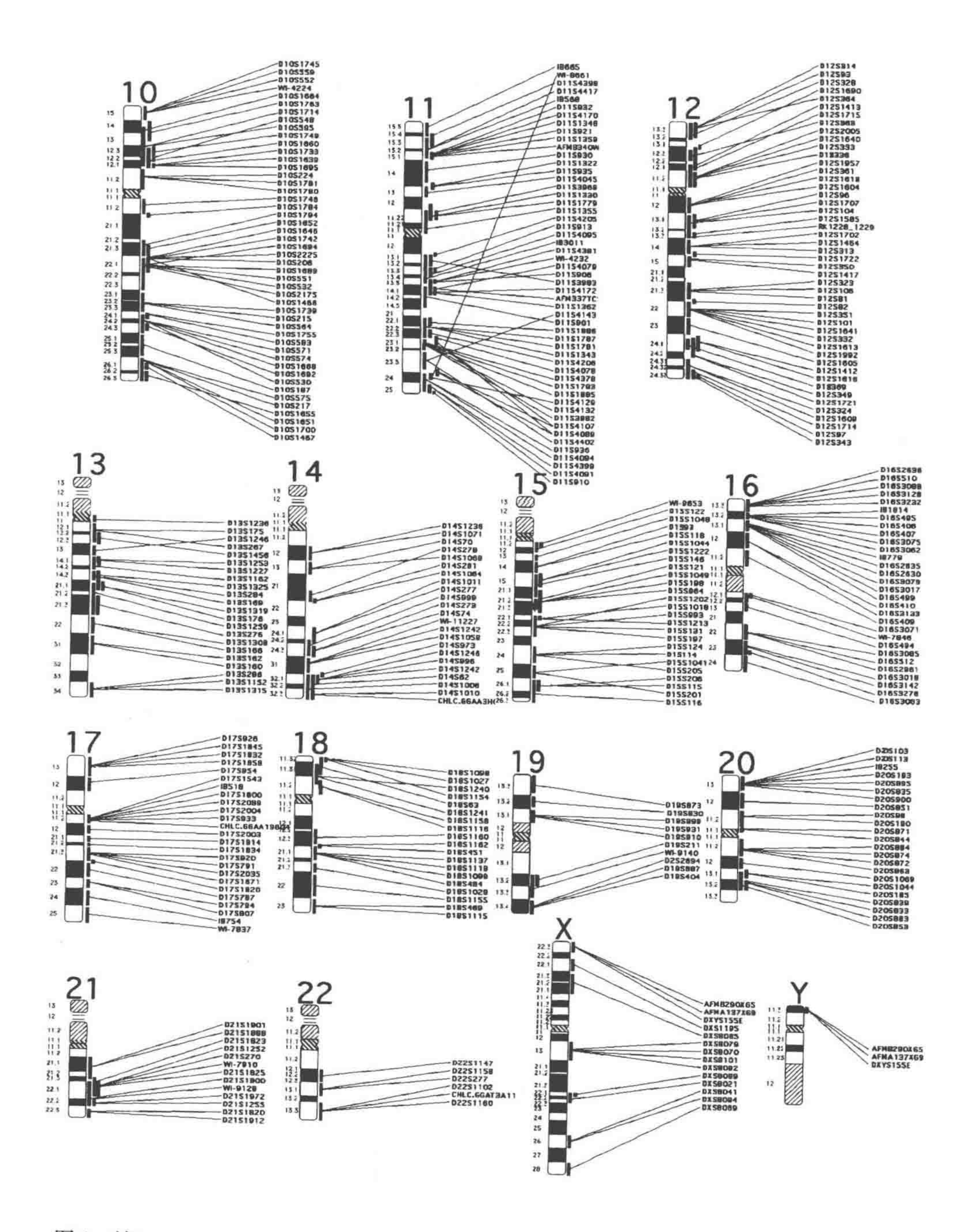


图 1（续）

2. 材料

2.1 仪器设备和厂家

1. 荧光显微镜（Zeiss Axiovert 135），7个滤光片（Chroma Technology）。
2. 冷CCD照相系统（Photometrics CH250）。
3. 相差显微镜（Zeiss Axiophot 20）。
4. 玻片电热板（Precision）。
5. 分光光度计（Beckman）和荧光光度计（Turner Designs）。
6. 水浴摇床（Precision）。
7. 37℃恒温培养箱（Fisher Science）。
8. 冰冻载玻片（25mm×75mm）（Allegiance）。
9. 盖玻片（25mm×50mm，22mm×40mm，22mm×22mm)(Allegiance）。
10. 空气浴摇床。

2.2 试剂

2.2.1 BAC DNA 提取

1. TB培养基（Life Technologies）：按48.2g/L加入纯化水，混合，溶解，加入8mL甘油，121℃高压灭菌15min。冷却至55℃，加入氯霉素（Sigma）至12.5μg/mL。

2. RNase溶液：50mmol/L Tris-HCl，pH 8，10mmol/L EDTA和RNase A（100μg/mL）（Life Technologies）。

3. DNA提取试剂盒：NucleoBond Nucleic Acid kit（ClonTech）；QIAGEN Plasmid Midi/Maxi kit（Qiagen）。

4. 苯酚：氯仿（Life Technologies）。

5. 琼脂糖（Life Technologies）。

6. 1kb DNA marker（Gibco-BRL）。

2.2.2 染色体制备

1. 细胞培养基：RPMI 1640（Life Technologies）加入L-谷氨酰胺（2mmol/L）（Sigma），15%胎牛血清（Sigma），青霉素（100IU/mL）(Life Technologies），链霉素（0.05mg/mL）(Life Technologies)，0.02%植物血细胞凝集素（PHA）(Life Technologies）。

2. Hank 平衡盐溶液（Life Technologies）。

3. 5-溴脱氧尿嘧啶（Sigma）。

4. 胸腺嘧啶（Life Technologies）。

5. 秋水仙胺（Life Technologies），10mg/mL。4℃保存。

6. 低渗溶液（0.075mol/L KCl）：5.6g KCl 溶于 1L 蒸馏水中。

7. 固定液：冰乙酸∶甲醇＝1∶3（V∶V）。使用前新鲜配制，放置冰上。

2.2.3 探针 DNA 标记

1. Nick-translation kit 和 Bionick-translation kit（Life Technologies），－20℃保存。

2. 地高辛-11-dUTP（Boehringer Mannheim），1mmol/L，－20℃保存。

3. fluorolink Cy3-dCTP（Amersham Pharmacia Biotech），－20℃保存。

4. fluorolink Cy5-dCTP（Amersham Pharmacia Biotech），－20℃保存。

5. DNase I（Gibco-BRL），－20℃保存。

6. G50 Sephadex Quick spin column（Life Technologies），－20℃保存。

2.2.4 FISH 和杂交后检测

1. 人 Cot 1™-DNA（Life Technologies），1mg/mL。－20℃保存。

2. 鲑鱼精子 DNA（3′-5′），－20℃保存。

3. 3mol/L 乙酸钠（Sigma）。

4. 牛血清白蛋白（Sigma），4℃保存。

5. 亲和素- FITC（Vecter Labs）。

6. 山羊抗地高辛罗丹明（Boehringer Mannheim）。

7. 色霉素 A3（Sigma），0.5mg/mL（溶于 50% McIlvane 缓冲液）。

8. 远端霉素 A（Sigma），0.1mg/mL（溶于 50% McIlvane 缓冲液）。

9. 变性液[70% 甲酰胺（EM Science）/ 2×SSC]：35mL 甲酰胺、10mL 蒸馏水、5mL 2×SSC，pH 7.0，4℃保存，每 2～4 周新鲜配制一次。

10. 系列乙醇：70%、80%、100%的乙醇（蒸馏水配制），放置冰上。

11. 杂交液：10%（V/V）硫酸葡聚糖（Sigma），50%甲酰胺（EM Science），2×SSC，pH 7.0，－20℃保存。

12. 甲酰胺（Fisher）和 2×SSC 洗液：15mL 20×SSC、60mL 蒸馏水、甲酰胺 75mL，调 pH 7.0，4℃保存。

13. 20×SSC：3mol/L NaCl，0.3mol/L 柠檬酸钠，pH 7.0。

14. 4×SSC/0.1% Tween-20（Sigma）：100mL 20×SSC、400mL 蒸馏水、0.5mL Tween-20，混合均匀。

15. TE（Tris/EDTA）缓冲液：1×TE，即 10mmol/L Tris-HCl，1mmol/L EDTA，pH 7.4、7.5 或 8.0。

16. 1mol/L Tris-HCl，pH 7.5 或 8.0。

17. 0.5mol/L EDTA，pH 8.0。

18. McIlavane 缓冲液（pH 9.0）：柠檬酸 0.63g，磷酸钠 6.19g，500mL 蒸馏水。

19. 抗淬灭剂[7]：溶解 100mg *p*-二氢氯苯二胺（Sigma）于 10mL PBS。用 0.5mol/L $NaHCO_3$ 缓冲液（0.42g $NaHCO_3$ 溶于 10mL 水中，NaOH 调 pH 至 9.0）调节 pH 至 8。加入 90mL 甘油，－20℃保存。

3. 方法[8]

3.1 中期染色体制备和选片（见注释 5）

1. 人外周血淋巴细胞在细胞培养基中 37℃培养 72h。

2. 加入 5-溴脱氧尿嘧啶（0.8mg/mL）处理 16h，将细胞阻断在 S 期。

3. HBSS（Hank 平衡盐溶液）洗细胞一次，除去阻断剂，加入含 2.5mg/mL 胸腺嘧啶核苷的细胞培养基，继续培养 6h。

4. 收获前 10min 加入 0.1μg/mL 秋水仙胺，收获的细胞用 0.075mol/L KCl 于 37℃低渗处理 15min，使用新鲜配制的固定液反复固定 4 次。

5. 制备高质量的染色体片子：将一滴细胞悬液自 1m 高处摔落在乙醇处理过的玻片上，使中期染色体分散，接着在一个装满接近沸腾的水容器上放置 20～40s（可随环境湿度和具体染色体情况调整熏片的时间）。每张染色体片应经过相差显微镜检查，如果在分散的中期周围残存可见的细胞质，将剩下的细胞悬液用固定液反复洗涤再滴片。理想的染色体中期分裂相应均匀分散，染色体致密、形态清晰（见注释 6）。如果染色体形态模糊或有毛边，说明熏片时间过久。制好的片放置室温下，暗处保存 2～3 周，随后保存在－70℃备用。

6. FISH 实验前，应在相差显微镜（10×）下阅片，选择杂交区域，保证一个视野内至少有 5 个分散好的中期，用玻璃笔标出杂交区域。

7. 如果片龄超过 2 周，通常省略 RNA 酶处理，这并不会影响信噪比。如果需要 RNA 酶处理，则于 37℃加 100μg/mL 的 RNA 酶处理、30min，之后经系列乙醇（70%、90%和 100%）脱水后备用。

3.2 BAC DNA 提取（见注释 7）

下列所用试剂购自 Qiagen，用于制备 20～50μg DNA（QIAGEN plasmid

Midi/Maxi kit)，也可根据生产条件的不同选择 NucleoBond BAC Miniprep kit 或 NucleoBond BAC Maxi kit（ClonTech）。

1. LB 琼脂平板（12.5μg/mL 氯霉素）划菌，37℃培养过夜。

2. 挑取单克隆，接种在 100mL LB（12.5μg/mL 氯霉素）中 37℃培养过夜。测定 OD_{600} 为 1.4～1.6。

3. 转入 250mL 离心瓶，3000g 离心菌液 15min。

4. 在 10mL RNA 酶溶液中重悬菌液，将菌团完全打散，转入 Oak Ridge 管中（Allegiance）。

5. 加入 10mL 0.2mol/L NaOH /1%SDS 溶液，轻柔缓慢地颠倒 10 次，混匀溶液，室温静置 5～10min，确定溶液从混浊变澄清。

6. 加入 8mL 冰冷的 3mol/L 乙酸钾（pH 5.5），缓慢地颠倒 10 次，混匀溶液（用力过猛可能污染大肠杆菌的基因组 DNA），冰上放置 15min。

7. Sorvall RC 28S 离心机，SS34 转子（8 管）或 SA-600 转子（12 管），4℃，33 000g 或更大转速（16 000r/min ，SA-600）离心 30min，迅速移出上清。

8. 用 25mL 吸管小心的移出上清，避免吸出沉淀，上清移入干净无菌的 Oak Ridge 管中。

9. 按照步骤 6 再次离心。即使上清液非常澄清，但为了防止柱子的堵塞最好做此步。将上清转入 50mL 管中，冰上保存。

10. 用 4mL QBT 缓冲液平衡“Qiagen-100”柱。

11. 将上清上柱。

12. 10mL QC 缓冲液洗涤 Qiagen-100 柱 2 次。

13. 60℃下用 5mL QF 缓冲液洗脱 DNA，将洗脱液收集到已加入 5mL 异丙醇的 14mL 培养管（VWR，目录号 60818-725）中。

14. 4℃，11 700g 离心 30min。使用 Sorval SA-600 转子，9000r/min～11 700g 离心。

15. 用 5mL 70% EtOH 于室温下洗涤沉淀，再次离心 10min，小心地倒掉上清，空气干燥 10min（这一步可以除去 BAC DNA 中多余的盐）。

16. 加入 400μL TE，用切掉末端的枪头吹打重悬 DNA，因为 BAC DNA 很大，所以需要较长的时间完全重悬 DNA，也可以将管在室温下放置过夜，使 DNA 完全溶解。随后，将 DNA 转入 1.5mL Eppendorf 管中。

17. 加入 400μL 苯酚：氯仿（1：1），振荡混匀，在微型离心机上最大转速离心 5min（见注释 7）。

18. 将上边的水相转入干净的 1.5mL Eppendorf 管中。

19. 加入 40μL 3mol/L NaOAc 和 1100μL 冰冷的无水乙醇，－20℃放置 2h，沉淀 DNA。

20. 最大转速离心 30min，用 750μL 冰冷的 70%乙醇洗 2 次。

21. 用 50μL TE 缓冲液溶解沉淀，可在 4℃保存；如果沉淀团块比较大，在 37℃条件下放置过夜。

22. 预计产量为 20～50μg，在 50μL 体积中浓度为 0.5～1μg/μL。

23. 紫外分光光度计或荧光光度计确定 BAC DNA 的产量。用琼脂糖凝胶电泳确定 BAC 的完整性。

3.3 探针 DNA 标记（见注释 8）

下述实验步骤采用缺口平移试剂盒（Nick-translation kit）（Gibco-BRL Life Technologies）。

1. 在 5 种 dNTP 混合物中选择适合的 dNTP 混合物（含除了用生物素或地高辛标记的 dNTP 外的所有的 dNTP），放在冰上融化。DNase I/DNA 聚合酶 I 放在冰上或−20℃备用。

2. 将 1.5mL Eppendorf 管放置冰上，加入下述试剂：5μL dNTP 混合物、*X*μL BAC DNA 溶液（含有 1μg DNA）、1μL 地高辛-11-dUTP（用于地高辛标记）、*Y*μL 蒸馏水将总体积调至 42μL，稍混匀。*X* 和 *Y* 的数量由 DNA 的浓度决定。

3. 加入 5μL DNase I/DNA 聚合酶 I 混合物和 3μL 1/1000 稀释的 DNase I（3mg/mL）。轻柔但充分地混匀，离心机上离心 5s，将挂壁的液滴甩下来。

4. 15℃孵育 60min。

5. 取 5μL 上述的标记溶液，1.2%琼脂糖凝胶电泳，与 1kb DNA marker 对比，确定 DNA 片段的长度。

6. 若片段长度为 100～500bp，则加入 5μL 终止缓冲液；若片段长度大于 500bp，则加入 1/100 稀释的 DNase I（3mg/mL），继续孵育 15～40min（时间长度根据 DNA 片段的长度确定）。

7. 未结合的核苷酸采用层析（Sephadex G-50）分离或乙醇沉淀。

3.4 FISH

3.4.1 杂交

1. 67～70℃变性液中变性染色体片子 10s～2min（见注释 6）。

2. 0.1 倍体积的 3mol/L 乙酸钠和 2.5 倍体积的冰冷的 100%乙醇沉淀 100～200μg 探针 DNA、3μg Cot-1 DNA 和 7μg 鲑鱼精子 DNA。用 10μL 杂交液重悬沉淀。

3. 75℃水浴变性探针 5min，37℃水浴中预复性 30min。

4. 经变性并预复性的 10μL 探针加到变性过的染色体片子上，盖上盖玻片，轻轻挤压除去气泡，橡皮泥封片。

5. 片子放在湿盒中 37℃杂交过夜。

3.4.2 杂交后洗脱和检测（见注释 9）

1. 在装有 2×SSC/50% 甲酰胺洗液的 44℃的水浴中，洗片 4 次，每次 5min（直接标记的探针，在此步后可直接进行后面的染色体复染）。

2. 50℃水浴摇床，0.1×SSC 中洗片 3 次，每次 5min。

3. 片子的杂交区域加上 100μL 封闭液（4×SSC/3%BSA/0.1% Tween-20），盖上 22mm×50mm 的盖片，37℃湿盒孵育 20min。

4. 移去盖片，迅速甩掉封闭液，加上检测溶液。生物素标记的探针，使用亲和素-FITC（5μg/mL 溶于 0.4μg/mL 4×SSC/1%BSA/0.1% Tween-20）；地高辛标记的探针，使用山羊-抗地高辛抗体（0.4μg/mL 溶于 0.4μg/mL 4×SSC/1%BSA/0.1%Tween-20）。

5. 加上检测溶液的杂交区域盖上盖片，37℃湿盒孵育 30min。

6. 移去盖片，于 42℃下在 2×SSC（0.1% Tween-20）中洗片 3 次，每次 5min。

3.5 染色体复染（R 带）（见注释 10）

为了同时观察染色体带型和 FISH 信号，采用了色霉素 A3（chromomycin A3）和偏端霉素 A（distamycin A）作为复染剂。比起 DAPI 染色得到的 Q 带，这种 R 带的带型更加清晰、可稳定重复。尽管 CA3 和 FITC 的发射光谱有部分重叠，但是可以通过适当的滤光片分别观察。

1. 在 1/2 McIlavane 缓冲液（pH 9.0）中漂洗标本，甩掉多余液体。

2. 标本上滴加 100μL CA3（0.5mg/mL 溶于 50% McIlavane 缓冲液，pH 9.0），室温染色 40～60min。

3. 在 50% McIlavane 缓冲液中，室温洗片 1min，甩掉多余液体。

4. 标本上滴加 50μL 0.1mg/mL 偏端霉素 A，室温染色 1～2min。

5. 在 1/2 McIlavane 缓冲液中漂洗片子 10～20s。

6. 加上一薄层的抗淬灭剂，盖上盖玻片（20mm×50mm）。

3.6 显微阅片和图像分析（见注释 11）

1. 分析原位杂交片子可采用两种不同的 Zeiss 荧光显微镜进行肉眼观察、拍

照，或者电子图像捕捉结合数字图像处理。单色 FISH 产生的黑白图像采用 Zeiss Axiophot 100 显微镜，Kodak Technical pan ASA100 黑白胶片拍摄。单色、双色或多色 FISH 实验中，采用 Zeiss Axiophot 135 显微镜配备 200W 汞灯，冷 CCD 照相系统捕捉彩色图像，BDS（Biological Detection System）软件进行处理。

2. 多重标记探针同时与染色体片子杂交，采用单带通滤光片或多带通滤光片依次观察。我们使用 63×，1.2N. A. 物镜和滤光片系统来激发和观察德克萨斯红或罗丹明、FITC 或 Cy3、CY5 荧光素。CA3 和 DA 的染色体 R 带型采用阿的平（quinacrine）滤光片系统观察。

3. 检测染色体非整倍性或重排，应选择好的杂交区域中的 20 个中期细胞进行评估。该区域的细胞应具有高信噪比、分散比较好的中期分裂相。抓取代表性图像，并将原始图片保存在专门的文件夹中，不应经过增强、修正或涂改。

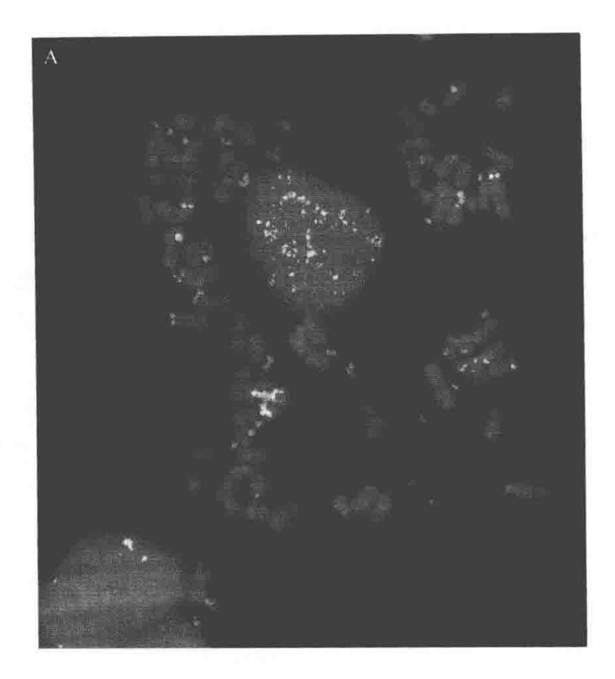
4. 注释

1. 与 BAC 等成熟的资源共同使用，FISH 技术成为定位人类基因和新的染色体断裂点的最迅速准确的方法。另外，稳定的高分辨染色体带型有助于 FISH 杂交确定染色体重排。根据有序列资料的 BAC 克隆，研究者可以迅速将细胞遗传学的结果与序列相联系，并进一步应用信息进行广泛的分子细胞遗传学分析。

2. 我们举两个例子说明 BAC 资源库在分子细胞遗传学中的应用：肿瘤与生殖有关非整倍体的检测。其他的应用包括 21 号染色体的分析[10]、癌症[11]、基因分离[12]和 Williams 综合征的基因组组织和构造[13]、染色体非整倍性分析[14]。

3. 例 1 中（图 2A）将资源库中 BAC 克隆的探针与原发性甲状腺滤泡癌病例的染色体进行 FISH 杂交，进一步证实之前采用比较基因组杂交（CGH）发现的 2q21 的特异区域扩增，FISH 对于将 CGH 观察到的低分辨的扩增与 DNA 序列相联系是非常重要的。实验结果确定了一种候选基因 $PKC\varepsilon$，它可能在甲状腺肿瘤发生中起作用[11,15]。在这项研究中 BAC 的应用证明：染色体区带特异性 BAC 有助于识别未知的对肿瘤发生起作用的新基因，以及确定扩增区域的分子结构。

4. 例 2 染色体非整倍性分析（图 2B），采用与染色体 21q22.1-22.3 相关的 BAC 探针与染色体 8p23.3 进行 FISH 杂交，缩小与此出生缺陷有关的染色体断裂点的范围。对比传统细胞遗传学的结果，我们发现伴随着 D21S65-D21S55 的缺失，存在端粒标记物 D21S38 和 S100B 的易位。临床结果显示唐氏综合征标记物 D21S55 和 D21S65 的缺失，该区段到端粒的标记物二倍体。对 8p 而言，6 个 BAC 确定其末稍带，只有最末端的缺失，这说明 8p 缺失对于孩子的出生缺陷表型的贡献可能极小。断裂点 STS 的确定也将候选基因与孩子缺陷性状相联系。



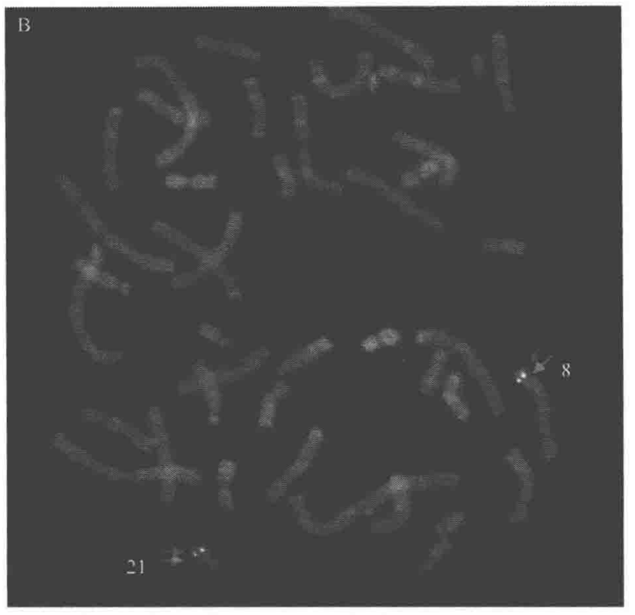


图 2 （A）BAC 1D9 在甲状腺滤泡癌细胞系 WRO 中的 FISH 图像。除了检测到 2p21 的 FITC 信号（黄色点）为 3 个拷贝的正常 2 号染色体以外，在双微染色体和相近的间期核中也可看到很明显的信号簇，代表 2p21 的扩增。(B) 用整合 BAC 资源库中与 STS 相连的 BAC 克隆进行双色 FISH，分析 21 号和 8 号染色体之间的易位[1]。BAC D21S348（用生物素-14-dATP 标记）和 D21S231（用地高辛-11-dUTP 标记）同时进行与中期染色体分裂相杂交，分别用 FITC（绿色信号）和罗丹明（红色信号）检测。两个标记物均揭示出从 21q22.3 到 8p23.3 的易位（见书后彩图）。

5. 为了得到稳定的 FISH 结果，应注意下述涉及从染色体制备到图像捕捉每一步操作的要点，最重要的步骤之一是如何得到高质量的染色体标本，其他如 DNA 变性、杂交探针检测条件与之相比显得无足轻重。我们将按实验顺序说明各个应注意的要点。

6. 中期染色体片子的质量和标本预处理对得到好的信号至关重要。高质量的染色体片子应满足下述标准：①中期染色体均匀分散，残留的细胞质越少越好；②几乎没有染色体重叠；③染色体形状清晰可辨。为得到这样的片子，应注意调整下述条件：低渗处理时间和细胞固定、滴片和蒸汽熏片、烤片、染色体变性时间（新鲜制备的染色体处理需要较短的变性时间）。适当的调整实验条件才能得到形态清晰的染色体，不会出现“毛边”现象。这样探针才能够更有效地结合靶 DNA，提高结合效率。

7. 使用多家公司的试剂盒同样都能得到高质量的 BAC DNA。步骤 17～21（本章 3.2）是提取高质量的 DNA 必需的步骤。DNA 中不能含有可能抑制 DNA 聚合酶活性的杂质，如金属、去污剂等。通常碱性裂解 DNA 应经过苯酚/氯仿抽提和异丙醇沉淀的处理。

8. 许多标记方法都适用于定位 BAC 克隆的 FISH，包括缺口平移或随机引物法，每种都有直接和间接标记试剂。比起随机引物法，缺口平移标记的探针可以得到较高的信噪比，但使用的 DNA 量要多 10 倍。用于直接标记的试剂（如荧光素标记的核苷酸）比用于间接标记的试剂（如生物素或地高辛）昂贵得多。当使用 BAC 作为探针的时候，两种标记方法能得到同样清晰的信号。我们通常采用缺口平移试剂盒标记，使用生物素-14-dATP 或地高辛-11-dUTP 做间接标记，fluorolink Cy5-dCTP 和 fluorolink Cy3-dCTP 用做直接标记。除 DNA 酶浓度和孵育时间外，完全按照试剂盒提供的操作步骤进行实验。标记后的 DNA 片段的大小很重要，应在 100～500bp，片段长度等于或大于 1000bp 时，将产生高背景，弱信号，导致实验失败。

9. 封闭和检测步骤也很重要，应注意正确的顺序和试剂。整个信号检测过程中，每一步都要很小心；片子绝不能干燥，即使只是部分的片子干燥就会影响结果。尽管甩掉片子上的液体避免稀释抗体或下一步的试剂也很重要，但是应尽可能的迅速进行操作。一旦片子干燥，背景将会很高、信噪比将大大降低。

抗体应小量分装后保存在－20℃。保存超过一年的抗体使用时浓度应加倍，如果产生高背景，可以使用 Sephadex G-50 柱纯化抗体，这样可以恢复正常的信噪比；如果信号太弱，换用新的抗体。

10. 如我们之前在方法[8]中所述，采用最老的片子，几个月到几年（＜10 年）同样可以得到最好的染色体带型。但是老片子不能得到明亮的 FISH 信号。因此，为了同时得到清晰的带型和明亮的信号，新制备的片子应在 50～55℃烤 4h（烤 15h 不会影响信号）。室温（20～25℃）老化片子 2～4 周后，将片子保存

在−70℃备用。CA3染色新鲜的片子时，应将染色时间延长到1.5h，老片子的染色时间可相应的缩短到30min。抗淬灭剂对于防止信号猝灭很重要，但是使用时只需要薄薄的一层即可。

11. 选择进行图像捕捉和处理的中期应满足下述标准：①同源杂交信号明亮；②背景低；③染色体重叠少或没有重叠；④染色体细长但结构致密。绝大多数的荧光素淬灭迅速，包括色霉素得到的R带，因此，片子暴露在激发光源下的时间尽可能得短。为确定一个BAC DNA，应计数至少10～20个细胞，保存至少两张图片进行分析。如果需要，应适当提高信号强度以识别额外的杂交信号，因为有些信号可能因较低的信号强度而没有被观察到。如果BAC用于细胞遗传学分析，应发展出一个质量控制标准，这对实验的成功至关重要。

（陈　艳 译，刘青杰　陈晓宁 校）

参考文献

1. Korenberg, J. R., Chen. X.-N., Sun, Z., et al. (1999) Human genome anatomy: BACs integrating the genetic and cytogenetic maps for bridging genome and biomedicine. *Genome Res.* **9,** 994–1001.
2. Cheung, V. G., Nowak, N., Jang, W., et al. (2001) Integration of cytogenetic landmarks into the draft sequence of the human genome. *Nature* **409,** 953–958.
3. Bolzer, A., Craig, J. M., Cremer, T., and Speicher, M. R. (1999) A complete set of repeat-depleted, PCR-amplifiable, human chromosome-specific painting probes. *Cytogenet. Cell Genet.* **84,** 233–240.
4. Lichter, P. (1997) Multicolor FISHing: what's the catch? *Trends Genet.* **13,** 475–479.
5. Langer, P. R., Waldrop, A. A., and Ward, D. C. (1981) Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **11,** 6633–6637.
6. Pinkel, D., Straume, T., and Gray, J. W. (1986) Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83,** 2934–2938.
7. Johnson, G. D. and Nogueira Araujo, G. M. (1981) A simple method of reducing the fading of immunofluorescence during microscopy. *J. Immunol. Meth.* **43,** 349–350.
8. Korenberg, J. R. and Chen, X.-N. (1995) Human cDNA mapping using a high-resolution R-banding technique and fluorescence in situ hybridization. *Cytogenet. Cell Genet.* **69,** 196–200.
9. Mitelman, E. (1995) ISCN 1995 An International System for Human Cytogenetic Nomenclature.
10. Hubert, R. S., Mitchell, S., Chen, X.-N., et al. (1997) BAC and PAC contigs covering 3.5 Mb of the Down syndrome congenital heart disease region between D21S55 and MX1 on chromosome 21. *Genomics* **41,** 218–226.
11. Chen, X.-N., Knauf, J. A., Gonsky, R., et al. (1998) From amplification to gene in thyroid cancer: a high-resolution mapped bacterial-artificial-chromosome resource for cancer chromosome aberrations guides gene discovery after comparative genome hybridization. *Am. J. Hum. Genet.* **63,** 625–637.
12. Yamakawa, K., Huo, Y. K., Haendelt, M. A., et al. (1998) DSCAM: a novel member of the immunoglobulin superfamily maps in a Down syndrome region and is involved in the development of the nervous system. *Hum. Mol. Genet.* **7,** 227–237.

13. Korenberg, J. R., Chen, X.-N., Hirota, H., et al. (2000) VI. Genome structure and cognitive map of Williams syndrome. *J. Cogn. Neurosci.* **12(Suppl),** 89–107.
14. Chen, X.-N., Mitchell, S., Sun, Z.-G, et al. (1996) The Integrated BAC Resource: A Powerful New Molecular Tool For Prenatal Genetics. *Am. J. Hum. Genet.* **59(suppl)(4),** A12, Abstract #53
15. Knauf, J. A., Elisei, R., Mochly-Rosen, D., et al. (1999) Involvement of protein kinase Cepsilon (PKCepsilon) in thyroid cell death. A truncated chimeric PKCepsilon cloned from a thyroid cancer cell line protects thyroid cells from apoptosis. *J. Biol. Chem.* **274,** 23414–23425.
16. Hudson, T. J., Stein, L. D., Gerety, S. S., et al. (1995) An STS-based map of the human genome. *Science* **270,** 1945–1954.

英中文对照

A

Alagille syndrome	Alagille 综合征
Albright hereditary osteodystrophy-like phenotype	骨骼营养不良症遗传性营养不良样表型
Alpha-Thalassemia and mental retardation syndrome (ATR-16)	α-地中海贫血和智力障碍综合征
Amplification, oncogene	原瘤基因扩增
Aneuploidy	非整倍体
preimplantation diagnosis	植入前诊断
prenatal diagnosis	产前诊断
prenatal diagnosis using maternal blood	利用母亲血样的产前诊断
Angelman syndrome	Angelman 综合征
Aniridia Wilms' Tumor Association	无虹膜肾胚细胞瘤
Array CGH, *see* Microarray CGH	阵列 CGH，参考 CGH 芯片

B

BAC resource	人工细菌染色体资源库
BCR/ABL fusion, *see* Philadelphia chromosome	BCR/ABL 基因融合，参考费城染色体
Beckwith-Wiedemann syndrome	偏身肥大巨胎综合征（贝魏综合征）
Bioinformatics	生物信息学

C

Cancer cytogenetics, *see* also Interphase FISH	肿瘤细胞遗传学，参考间期 FISH
CGH analysis	CGH 分析
chromosomal gain and loss	染色体获得和丢失
CISH analysis	显色原位杂交分析
color banding	彩色显带
multicolor FISH	多色 FISH
spectral karyotyping	光谱染色体核型分析
translocations and gene rearrangement	易位和基因重排
Cancer genomics	肿瘤基因组学
Cat-eye syndrome	猫眼综合征
CD30, *see* Immunophenotypic marker	CD30，参考免疫表型标志物

English	中文
Neurofibromatosis	多发性神经纤维瘤

P

English	中文
Philadelphia chromosome, *see* Interphase FISH	费城染色体，参考间期 FISH
BCR/ABL fusion	BCR/ABL 融合
complex Ph-chromosome	复杂费城染色体
masked Ph-chromosome	伪装费城染色体
Polymorphic marker, *see* Microsatellite marker	多态性标记，参考微卫星标记
Prader-Willi syndrome	Prader-Willi 综合征
methylation	甲基化
uniparental disomy and imprinting	单亲二倍体和单亲印记
Pregnancy loss	妊娠终止
Preimplantation diagnosis of aneuploidy	非整倍体的植入前诊断
blastomere	卵裂球
first polar body	第一极体
FISH analysis	FISH 分析
second polar body	第二极体
Prenatal diagnosis using maternal blood	用母亲血样的产前诊断
aneuploidy detection	非整倍体检测
balanced translocation	平衡易位
distinguishing fetal cell from maternal cell	母亲血中胎儿细胞的识别
enrichment of fetal cell	胎儿细胞的富集
fetal cell type	胎儿细胞分类
frequency of fetal cell	胎儿细胞频率
gestational age	妊娠周龄
mosaicism	嵌合现象
sampling	取样
Prenatal diagnosis with interphase FISH	用间期 FISH 进行产前诊断
analytical performance	分析性实验
clinical performance	临床性实验
false positive and negative result	假阳性和假阴性结果
indication	指征
interpretation of result	结果的解释
limitation	限制性
maternal cell contamination	母亲细胞污染
mosaicism	嵌合现象
uninformative test	无任何信息的检测
Primed *in situ* labeling (PRINS)	引物介导的原位 DNA 标记
combinatorial labeling	组合性标记

English	中文
detection of single copy target	单拷贝目标序列的检测
detection of tandem-repeat DNA	串联重复 DNA 的检测
quantitative detection	定量检测
self-primed *in situ* labeling	自身引物介导的原位标记
Probe labeling	探针标记
DNA target	DNA 目标序列
asymmetric PCR	不对称性 PCR
chemistry	化学
direct vs indirect labeling	直接标记和间接标记
DNA source	DNA 来源
DOP-PCR	简并寡核苷酸引物 PCR
fluorophore labeling	荧光标记
fluorophore selection	荧光素选择
in situ reverse transcriptase PCR (*in situ* RT-PCR)	原位 RT-PCR
labeling with aliphatic amines	用脂族胺标记
nick-translation	缺口平移
probe concentration	探针浓度
probe for indirect detection	间接检测的探针
random priming	随机引物
reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)	逆转录 PCR
RNA target	RNA 目标序列
single-stranded probe	单链探针
ULS labeling	ULS 标记

Q

English	中文
Quality control	质量控制
in interphase FISH for CML	慢性髓细胞性白血病的间期 FISH
in interphase FISH prenatal aneuploidy detection	非整倍体产前检测的间期 FISH

R

English	中文
RT-PCR for CML	慢性髓细胞性白血病的 RT-PCR
Rubinstein-Taybi syndrome	Rubinstein-Taybi 综合征
Russell-Sliver syndrome, UPD	Russell-Sliver 综合征，单亲二倍体

S

English	中文
Saethre-Chotzen syndrome	Saethre-Chotzen 综合征
Sex chromosome marker	性染色体标志物

prenatally detected trisomy mosaicism 产前检测三倍体嵌合现象
rare disorder 罕见疾患
syndrome 综合征

V

Van der Woude syndrome 范德伍德综合征
Velocardiofacial syndrome, *see* 22q11 deletion syndrome 腭心面综合征，参考 22q11 缺失综合征

W

Williams syndrome Williams 综合征

X

Xp21 deletion Xp21 缺失
Xp22. 3 deletion syndrome Xp22. 3 缺失综合征

Y

Y chromosome deletion Y 染色体缺失
1p36. 3 deletion syndrome 1p36. 3 缺失综合征
17p11. 2 duplication 17p11. 2 重复
22q11 deletion syndrome 22q11 缺失综合征

(Q-1778.31)

生命科学实验指南系列·典藏版



图解微生物实验指南
免疫学技术及其应用
生物衰老：研究方法与实验方案
精编细胞生物学实验指南
植物蛋白质组学实验指南
蛋白质纯化指南（原书第二版）
环境基因组学实验指南
实验动物血液生理生化参考手册
生理学实验指南
精编免疫学实验指南
酵母遗传学方法实验指南
人干细胞培养
抗体制备及使用实验指南
病毒的电子显微学研究
植物生物学与生态学实验
神经生物学实验原理与技术
DNA微阵列实验指南
基因转移：DNA和RNA的转运与表达
生物实验室管理手册（原书第二版）
精编人类遗传学实验指南
单分子技术实验指南
现代蛋白质工程实验指南
活细胞成像（原书第二版）
遗传变异分析实验指南
表皮细胞实验指南
分子克隆实验指南（原书第三版）（上下册）
精编分子生物学实验指南（原书第五版）
现代神经科学研究技术
生命科学实验设计指南
现代生物化学与分子生物学仪器与设备
分子细胞遗传学——技术和应用
精编蛋白质科学实验指南
实验细胞资源的描述标准与管理规范
实验动物设施运行管理指南
元基因组学：方法和步骤（影印版）
现代工业微生物学实验技术
真核生物转录调控——概念策略与技术（原书第二版）
动物细胞培养——基本技术和特殊应用指南（原书第六版）



科学出版中心 生物分社
联系电话：010-64012501
E-mail：lifescience@mail.sciencep.com
网址：http://www.lifescience.com.cn

销售分类建议：分子生物技术



赛拉艾芙
生命科学订阅号



本书彩图请扫码

www.sciencep.com



定价（全套）：4500.00元

[General Information]
书名=分子细胞遗传学技术与应用=MOLECULAR CYTOGENETICSPROTOCOLS AND APPLICATIONS
作者=（加）范耀山著；刘青杰等译
页数=421
SS号=14076120
DX号=
出版日期=2016.07
出版社=科学出版社